

[JP,2002-526088,A]

\* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] the following gene field: F1 subunit of the fusion glycoprotein gene of RSV Hemagglutinin neuraminidase gene of PIV-1 5'5 of 16S rRNA array enterovirus of 16S rRNA array C.pneumoniae of non-coding region M.pneumoniae' non-coding region of a PIV-3 fusion-protein gene Non-structure protein gene of the influenza A origin the non-structure protein gene of the influenza B origin -- and -- Hexone gene of adenovirus.

The detection approach of acute sinopulmonary intection including carrying out simultaneous magnification of some target nucleotide sequences which exist in a biological sample by using primer mixture including at least one primer set originating in \*\*\*\*\*.

[Claim 2] The approach according to claim 1 currently transposed to the primer to which this 16S rRNA primer originates in the spacer field between 16S rRNA array and 23S rRNA array.

[Claim 3] The approach according to claim 1 or 2 by which at least one primer pair for furthermore detecting B.pertussis and B.parapertussis specifically is also used.

[Claim 4] The approach according to claim 1 to 3 this primer is what is chosen from a table 2 or a table 4.

[Claim 5] Then, it is the approach according to claim 1 to 4 by which this magnification product is detected using the probe preferably chosen from a table 3, a table 4, or a table 5.

[Claim 6] Array number: The primer chosen from 17, 18, 19, 20, 21, 22, and 23.

[Claim 7] Array number: The probe chosen from 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, and 34.

[Claim 8] The kit including the set of the primer for performing an approach according to claim 1 to 4 for detecting acute sinopulmonary intection.

[Claim 9] The kit including the set of the probe for performing an approach according to claim 5 for detecting acute sinopulmonary intection.

[Claim 10] They are a solid-state base material and the kit according to claim 9 with which this probe is preferably applied as a concurrency line on the nylon film.

[Claim 11] The kit containing at least one primer according to claim 6 for detecting acute sinopulmonary intection.

[Claim 12] The kit containing at least one probe according to claim 7 for detecting acute sinopulmonary intection.

---

[Translation done.]

**[JP,2002-526088,A]**

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

**DETAILED DESCRIPTION**

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

This invention relates to the field of detection of acute sinopulmonary infection at detection of a microorganism, and a twist detail.

[0002]

Acute sinopulmonary infection (ARI) is the cause by which a disease of the child in the world and death were most common, and depends about 30% of death of a developing country's child on this (Hinman et al., 1998). fit in in advanced nations -- immense to ARI, although it is alike and deer death is not caused -- direct and indirect healthy care costs are needed (Garenne et al., 1992; UNICEF, 1993; Dixon, 1985). The cause of ARI includes an extensive microorganism. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* (Barlett and Mundy, 1995) are bacteria found out most frequently. Although the symbiont of an upper respiratory tract is mixed in usual at the sputum sample, the nasopharynx attraction object, or the swab, if the invasion-technique (apex-of-a-lung prickle) is not used, it is difficult to prove those etiology-roles in ARI by upper respiratory tract sampling (Trolfors and Claesson, 1997; Nohynek et al., 1995).

[0003]

In contrast with these bacteria, detection of *Mycoplasma pneumoniae* in the child who has the symptoms of a breather, and *Chlamydia pneumoniae*, and detection of a virus are considered to be the evidence of acute infection by usual. A cell culture, quick antigen detection assay, the serological approach (indirect), and recently, the current approach for identifying these pathogens includes PCR (Trolfors and Claesson, 1997; Saikku, 1997). A cell culture method needs a special laboratory, requires costs and time amount, and is tight work. Quick antigen assay can be used only for the microorganism (it sets in most countries and they are Influenzas A and RSV) of 2-3. It is necessary to investigate antibody concentration lifting in a blood sample with the serological approach from an acute stage to [ blood sample ] convalescence, and therefore, a test result is obtained too slowly for usual, and it is not suitable for the therapy of acute disease. although the quick approach for current and a microorganism diagnosis of ARI usually used cannot be used -- the availability of this trial -- the difference of extent -- that -- the therapy in the antibiotic which suited accuracy is enabled and the appearance of costs, a side effect, and resistance is controlled -- will come out and I will be (Woo et al., 1997). The nucleic-acid amplifying method available now like PCR (Saiki et al., 1988) and TR-PCR is an approach for detecting the nucleic acid originating in the virus and bacteria in a clinical sample that sensibility is dramatically high. These magnification approaches are advantageous to

especially detection of the living thing with culture "difficult" or it is difficult which is the handling like a breather syncytium virus (Panton et al., 1992) or *M.pneumoniae* (Van Kuppeveld et al., 1992).

The research before using PCR and RT-PCR for diagnosing ARI had put emphasis on detection of a single virus or bacteria. However, the usefulness in a diagnosis of the nucleic-acid amplifying method about the single contagium is limited that special pathogenesis can never be established when a result is negative, and by the ability not investigating the concurrent infection in which more living things than one sort participate.

By the multiplex PCR assay (Hassan-King et al., 1996, 1998; Messmer et al., 1997) and Gilbert et al. (1996) were officially announced for pathogen simultaneous detection, saying, the multiplex RT-PCR panel to the indicated breather sample has the fault, respectively, requires time amount for the assay conditions of each detected microorganism, and uses several test tubes about the sample of 1, and, therefore, the danger of cross contamination increases.

[0004]

Our strategy for conquering these limits is using the multiplex TR-PCR (multiplex PCR) protocol which will enable simultaneous detection of the respiratory disease original object which includes the RNA virus (the enterovirus, Influenza A and the B virus, the parainfluenza-viruses types 1 and 3, breather syncytium virus), DNA virus (adenovirus), and bacteria (*C.pneumoniae*, *M.pneumoniae*) which do not form a colony in one day for a child's upper respiratory tract usual.

[0005]

It is the object of this invention to offer the approach and kit for detecting acute sinopulmonary intection.

It is the object of this invention to provide a detail with the multiplex PCR method and the kit for detecting acute sinopulmonary intection more.

It is also the object of this invention to offer the primer and probe of acute sinopulmonary intection useful to detection.

In a detail, more this invention The following gene field: F1 subunit of the fusion glycoprotein gene of RSV Hemagglutinin neuraminidase gene of PIV-1 5' non-coding region of a PIV-3 fusion-protein gene 16S of *M.pneumoniae* rRNA array 16S rRNA array of *C.pneumoniae* 5' non-coding region of enterovirus Non-structure protein gene of the influenza A origin The non-structure protein gene of the influenza B origin, It reaches. Include carrying out simultaneous magnification of some target nucleotide sequences which exist in a biological sample by using primer mixture including at least one primer set originating in each of the hexone gene of adenovirus. It is related with the detection approach of acute sinopulmonary intection.

[0006]

Since decision of the existence of the following microorganism mainly infected with a child's respiratory tract is enabled at the magnification process of 1, this multiplex RT-PCR method is

:RSV with this especially desirable multiplex RT-PCR method, parainfluenza viruses, *M.pneumoniae*, *C.pneumoniae*, enterovirus, in FURUEZA A and B, and adenovirus.

They are :*M.pneumoniae* also about the above-mentioned approach by which according to another example *Homo sapiens* parainfluenza viruses, Influenza A, B and RSV, and at least one following microorganism are detected when multiplex RT-PCR using the primer pair originating in the above-mentioned field is used for this invention, *C.pneumoniae*, enterovirus, or adenovirus.

They are :*M.pneumoniae* also about the above-mentioned approach by which according to

another example *Homo sapiens* parainfluenza viruses, Influenza A, B and RSV, and at least one following microorganism are detected when RT-PCR using the primer pair originating in the above-mentioned field is used for this invention, *C.pneumoniae*, enterovirus, or adenovirus.

According to the desirable example, this invention relates to the above-mentioned approach by which this 16S rRNA primer was replaced by the primer originating in the spacer field between 16S rRNA and 23S rRNA array.

According to another example, this primer originates in the spacer field between 16S rRNA and 23S rRNA array preferably about the above-mentioned approach by which at least one primer pair is used further in order that this invention may detect *B.pertussis* and *B.parapertussis* specifically.

According to another example, this invention relates to the above-mentioned approach the above-mentioned primer is what is chosen from a table 2 or a table 4.

According to another example, this magnification product is succeedingly detected using a probe, and this invention relates to the above-mentioned approach of being that as which this probe is preferably chosen from a table 3, a table 4, or a table 5.

According to another example, this invention relates to the primer chosen from a table 2 or a table 4. Moreover, this invention relates also to the activity of this primer in the above-mentioned approach. Moreover, this invention relates also to the manufacture approach of the primer of this invention.

According to another example, this invention relates to the probe chosen from a table 3, a table 4, or a table 5. Moreover, this invention relates also to the activity of this probe in the above-mentioned approach. Moreover, this invention relates also to the manufacture approach of the probe of this invention. It can be made to change so that the primer and probe of this invention may be explained in full detail later.

[0007]

According to another example, this invention relates to the kit including the set of the above-mentioned primer for performing the above-mentioned approach for detecting acute sinopulmonary intection. This kit other than the above-mentioned primer may contain the buffer required for a probe, magnification, and a request to perform a hybridization reaction and the kit description. Moreover, this invention relates also to the above-mentioned kit containing at least one above-mentioned probe.

In another example, this invention relates to the kit including the set of the probe for performing the above-mentioned approach for detecting acute sinopulmonary intection. This kit other than the above-mentioned probe may contain the buffer required for a primer, hybridization, and a request to perform a magnification reaction and the kit description. Moreover, this invention relates also to the above-mentioned kit containing at least one above-mentioned primer.

according to another example -- this invention -- the above-mentioned probe -- a solid-state base material top -- desirable -- a nylon film top -- concurrency -- the above-mentioned kit applied to a line -- it is preferably related with a LiPA kit (refer to the example shown later).

[0008]

The approach of this invention can be performed using different technique. Such technique may include fixing a target nucleic acid and performing hybridization with an indicator oligonucleotide probe subsequently in the solid-state base material after magnification. As an exception method, a probe may be fixed on a solid-state base material, an indicator target Pori nucleic acid may be used after magnification by request, and hybridization may be performed. This technique is called reverse hybridization. The convenient reverse hybridization technique is

line probe assay (LiPA, Innogenetics, Belgium). The oligonucleotide probe fixed by solid-state base material Kataue as a concurrency line is used for this assay. As an exception method, a probe may serve as a rank or a minute rank format, and may exist. The spot of the probe can be carried out on this rank, or in situ composition can be carried out in the separate location on a rank (Lockhart et al., 1996). It should be understood that any of other technique for detecting the above-mentioned target sequence by which simultaneous magnification is carried out is covered by this invention. This technique may include the sequencing method or other array methods which were learned for the field concerned.

[0009]

The following definitions and explanation will carry out possible [ of understanding this invention better ].

The target ingredient in the sample which should be analyzed may be DNA or RNA, for example, may be genomic DNA, messenger RNA, and a swollen version that was amplified. In this description, these molecules are also called "Pori nucleic acid."

The extract and the purification approach which were learned well from a sample to isolation of RNA or DNA can be fallen (for example, shown in Sambrook et al. and 1989).

The vocabulary "a probe" of this description says the single-strand oligonucleotide designed so that hybridization might be specifically carried out to a target Pori nucleic acid. The probe of this invention is the die length of about 5 thru/or 50 nucleotides, and is the die length of about 10 thru/or 25 nucleotides more preferably. Especially the die length of a desirable probe is 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, or 25 nucleotides. The nucleotide used for this invention may be a qualification nucleotide like the nucleotide containing ribonucleotide, deoxyribonucleotide and inosine, or the qualification radical to which a hybridization property is not changed intrinsically.

[0010]

The vocabulary "a primer" says the single-strand oligonucleotide array which can act on the nucleic-acid chain copied as a start point of composition of a complementary primer expanding product. The die length and the array of a primer must make composition of an expanding product have to start, and you have to deal in them. Preferably, a primer is the die length of about five to 50 nucleotide. Each die length and array will be based on the service condition of the primer like the complexity of required DNA or an RNA target, temperature, and ionic strength. As long as experiment conditions suit, he may use the primer of this invention as a probe, or the thing which may be reverse should be understood.

The pair of a primer with which the expression "a suitable primer pair" of this description enables specific magnification of the specific Pori nucleic-acid fragmentation is said.

This description probe or the "target field" of a primer has a probe or a completely complementary primer, or is an array in the complementary Pori nucleic acid which should be detected (that is, there is a certain amount of mismatch) selectively. It should be understood that it is a target sequence also with the complementary object of this target sequence suitable in a certain case.

As for the "specific hybridization" of a probe to the target field of the Pori nucleic acid, this probe forms the part or all the fields, and 2 chains of this target field in the bottom of an activity experiment condition, and, as for other fields of the polynucleotide which exists in the sample which should be analyzed under those conditions, this probe means not forming 2 chains.

As for the "specific hybridization" of a primer to the target field of the Pori nucleic acid, this primer forms the part or all the fields, and 2 chains of this target field in the bottom of an activity

experiment condition into a magnification process, and, as for other fields of the polynucleotide which exists in the sample which should be analyzed under those conditions, this primer means not forming 2 chains.

[0011]

In order to guarantee right magnification, the data that a magnification primer does not need to agree in the response target sequence and accuracy in mold are fully shown in reference (Kwok et al., 1990). However, it should take into consideration that the fragmentation by which the primer was amplified to those target sequences when not completely complementary probably has the array of a primer, and it does not have the array of a target sequence. An indicator may be carried out with the indicator (for example, biotin) which had the primer chosen. The magnification approach to be used Polymerase chain reaction (PCR; Saiki et al., 1988), Ligase chain reaction (LCR; Landgren et al., 1988; Wu & Wallace, 1989; Barany, 1991), The magnification based on a nucleic-acid array (NASBA; Guatelli et al., 1990; Compton, 1991), You may be any of other suitable approaches learned for the field concerned in which chain permutation magnification (solvent deasphalting; Duck, 1990), the magnification (Lomeli et al., 1989) using Qbeta replicase, or nucleic-acid magnification is possible.

This description is shown in the direction of 3' from 5' by making a probe and a primer array into a single-stranded-DNA oligonucleotide. It is clear to this contractor that the probe shown below can be used as to remain as it is, those complementary voice, or those RNA gestalten (T is replaced with U).

[0012]

The probe of this invention can be prepared by cloning the recombination plasmid containing the insertion including a response nucleotide sequence by starting a response nucleotide sequence from a cloning plasmid using sufficient nuclease, if required, and subsequently carrying out fractionation with molecular weight. For example, chemosynthesis of the probe of this invention can also be carried out with an idiomatic phospho-triester method.

The primer or the oligonucleotide used as a probe may contain the nucleotide analog like phosphoro CHIETO (Matsukura et al., 1987), alkyl phosphoro CHIETO (Miller et al., 1979), or a peptide nucleic acid (Nielsen et al., 1991; Nielsen et al., 1993), may consist of it, or may contain the intercalating agent (Asseline et al., 1984). Installation of these qualification may be advantageous to having effect of forward on the description like a hybridization reaction property, the reversibility of hybridization, and the biological stability of an oligonucleotide molecule.

[0013]

Although the vocabulary "a solid-state base material" says the base material to which coupling of the oligonucleotide probe can be carried out, an oligonucleotide probe holds the hybridization property and a certain thing serves as [ the background level of hybridization ] conditions until now [ low ]. A solid-state base material is a microtiter plate (for example, DEIA setting to low activity), the film (for example, nylon or a nitrocellulose), a minute ball (bead), or a chip usual. It may be convenient to embellish a nucleic acid, and to make immobilization easy, or to make hybridization effectiveness increase before application on the film or immobilization. This qualification includes coupling with coupling with a different reactant radical like a homopolymer tailing, an aliphatic series radical, two NH(s), a sulfhydryl group, and a carboxyl group or a biotin, hapten, or protein.

[0014]

The vocabulary "an indicator" means the activity of an indicator nucleic acid. An indicator may

be performed by \*\* which makes an indicator nucleotide incorporate in the polymerase process of magnification by Saiki et al. or (1988) Bej et al. (1990) as explained, using an indicator primer, or one of other approaches which were learned by this contractor. The property of an indicator may be isotope nature ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  grade), or may be non-isotope nature (a biotin, digoxigenin, etc.).

The vocabulary "a biological sample" or a "sample" says the nasopharynx attraction object containing DNA or RNA, a throat or a nasopharynx swab, a nasopharynx washing object, a trachea attraction object, or other respiratory tract samples.

[0015]

In order to design the probe which has a request property, the following useful guides known by this contractor are applicable.

Since extent and singularity of a hybridization reaction are influenced by many factors, whether or not it will be completely complementary, operating more than one or it of those factors will determine each exact sensibility and exact singularity of a probe to a target, so that this description may explain. The importance and effects of assay conditions of various are further explained in this description.

[probe: The stability of a target] nucleic-acid hybrid should be chosen so that assay conditions may be suited. Long AT abundance array can be avoided, a hybrid can be terminated by the C:G base pair, and this can be performed by designing a probe so that it may have  $T_m$  [ \*\*\*\* ]. The starting point and the terminal point of a probe are chosen so that about 2-10 degree C of  $T_m(s)$  may become high rather than the temperature to which the last assay is carried out by die length and GC content. The base composition of a probe is important. A G-C pair is because thermal stability is higher than an A-T base pair by hydrogen bond. Therefore, the hybridization in which the complementary nucleic acid of high GC content participates has more high thermal stability. The conditions like the ionic strength with which a probe is used in the case of a probe design, and incubation temperature should also be taken into consideration. It is known increasing as the ionic strength of a reaction mixture increases extent of hybridization, and that hybrid thermal stability will increase with the increment in ionic strength. On the other hand, the formamide which destroys hydrogen bond, the urea, and the chemical agent like alcohols will make the stringency of hybridization increase. Destabilization of hydrogen bond with this reagent may reduce  $T_m$  substantially. Generally, the optimal hybridization of the synthetic oligonucleotide probe of the die length of about ten to 50 base happens, when lower about 5 degrees C than the melting out temperature of 2 chains. The incubation of under optimum temperature makes hybridization of a mismatch base sequence possible, and, so, singularity falls.

The probe which carries out hybridization to the bottom of the condition of high stringency is desirable. Only the complementary nucleic-acid hybrid of an emergency will be formed in the bottom of a high stringency condition. The hybrid without an enough complementarity will not be formed. Therefore, the stringency of assay conditions determines the amount of a complementarity required between two nucleic-acid chains which form a hybrid. Extent of stringency is chosen so that the difference of the stability between a target nucleic acid, the formed hybrid, a non-target nucleic acid, and the formed hybrid may be made into max.

[0016]

The field in the targets DNA and RNA by which forming the powerful internal structure which blocks hybridization is known is not so desirable. Similarly, the probe which has a self-complementarity dramatically should also be avoided. As explained in the top, hybridization is a meeting of the complementary nucleic acid of two single strands, and forms 2 chains which

carried out hydrogen bond. When one side of two chains is contained in imperfection thoroughly in a hybrid, as for it, it is implicative that it could probably seldom participate in formation of a new hybrid. When there is sufficient self-complementarity, the intramolecular and the intermolecular hybrid which were formed into a certain type of probe molecule may exist. This structure is avoidable by designing a probe carefully. By designing a probe so that the substantial part of the object array may be a single strand, the rate and extent of hybridization can be increased substantially. This type of interaction can be searched using a computer program. However, this type of interaction may be unable to be avoided in a certain kind of example. Standard hybridization and washing conditions are indicated into the ingredient of an example, and the section of an approach. Other conditions are 3X SSC (sodium-citrate sailor in) and 20% deionization FA (formamide) in 50 degrees C. When the singularity and sensibility of a probe are maintained, other solutions (SSPE (sodium phosphate sailor in EDTA), TMAC (tetramethylammonium chloride), etc.) and temperature can also be used. To be required, it is necessary to maintain the singularity and sensibility which change the die length or the array of a probe slightly, and are needed under the given conditions.

[0017]

The vocabulary "a hybridization buffer" means the buffer which enables the hybridization reaction between a probe and the Pori nucleic acid which exists in a sample, or between a probe and a magnification product under a suitable stringency condition.

The vocabulary "a washing solution" means the solution which enables washing of the hybrid formed in suitable stringency conditions.

[0018]

Although this invention was generally explained, this invention will be understood still more easily by referring to the following example and a drawing. An example and a drawing are only for explaining the method of a lot of rain of this invention, and an example, and must not be interpreted as what limits this invention. All the reference mentioned in this description is made to unite with this description by source designation.

[0019]

Explanation of a table A table 1 shows the result obtained from the comparative study between m-RT-PCR-ELISA and Marketing EIA.

A table 2 shows the primer array used for the example 1.

A table 3 summarizes the version which suited the different probe and different LiPA application over the already indicated living thing which was identified.

A table 4 summarizes the array of the primer and probe originating in the 16S-23S rRNA spacer field of \*\* for bacteria pathogens.

A table 5 shows the array of the probe for RSV used for the example 3.

A table 6 shows the culture about 36 samples (blinded) of a single string performed in the example 3 by which the blind was carried out, and the comparison as a result of LiPA.

A table 7 shows the culture about a series of 30 samples about the culture of Mycoplasma pneumoniae using multiplex RT-PCR and LiPA which were performed in the example 3 by which the blind was carried out, and the comparison as a result of LiPA.

[0020]

Example example 1 code

acute sinopulmonary intection (ARI) ;P reverse transcription (RT-PCR); combined with CR -- the m-RT-PCR(m-RT-PCR-ELISA); influenza virus type A(influenzas A and InfA); influenza virus type B (influenzas B and InfB) combined with multiplex RT-PCR(m-RT-PCR); microwell



hybridization assay --; parainfluenza-viruses type 1(PIV-1); parainfluenza-viruses type 3(PIV-3); breather syncytium virus (RSV)

[0021]

An ingredient and an approach 1. patient's sample The nasopharynx attraction object was obtained from the child who has ARI which was in our facilities from November, 1995 before April, 1998. The diagnosis included pneumonia, wheeze bronchitis, bronchitis, the laryngotracheitis (this includes laryngitis, pharynx-trachea-bronchitis, and (false) croup), a pharyngitis, tonsillitis, rhinitis, the conjunctivitis, and otitis media, and depended them on the discharge diagnostic database by the computer of a cause of a disease. Although collection of a sample was not perfect in the first winter (from November, 1995 to April, 1996), it was perfect 95% or more on October 1, 1996. Samples were collected on the hospitalization first day, it saved at 4 degrees C first, and prepared to the trial, and what carries out [ direct progress and ] the mothball of whether it is used further behind was saved at -70 degrees C at the laboratory. Moderate attention was paid, the sample was distributed, contamination was avoided, and the part was directly used for detection of the RSV and the influenza A antigen using enzyme immunoassay (EIA) (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). It m-RT-PCR and ranked second, the following part was used for agarose gel electrophoresis, and the detail was investigated in microwell hybridization assay.

[0022]

2. Extract of nucleic acid The sample received from November, 1995 to July, 1997 was prepared as following. The breather sample of 100microl was acquired for all nucleic acids from the thing of 100microl diluted with the NaCl solution 0.9%. Sodium dodecyl sulfate was added and it considered as the 0.1% of the last concentration. Subsequently the 1:1 phenol-chloroform mixture of one volume extracted the nucleic acid under the chloroform of one volume once, and it was made to precipitate by 0.3M ammonium acetate and ethanol. The nucleic-acid pellet was dried and it re-suspended in 2 times distilled water with which jetty RUIRO carboxylic-acid processing of the 15microl was carried out. The received sample was prepared using "High Pure Viral Nucleic Acid Kit" (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) of Boehringer according to the description from August, 1997 to April, 1998.

control of a preparation procedure -- the following -- \*\* -- it carried out, and the electronegative sample (a healthy person's sputum) of :1 was given to each series of 5-10 samples, and it acted as the monitor of the possibility of cross contamination. When it was false-positive in a negative control, m-RT-PCR was repeated about all the electropositive clinical samples in the series concerned using another part of a clinical sample. The effectiveness of a preparation procedure was investigated to each trial using the positive control (respectively Influenza A, Influenza B, PIV- 1, PIV- 3 or RSV) obtained from culture. The prepared sample was immediately used for m-RT-PCR, and the remainder was saved at -70 degrees C.

[0023]

3. Multiplex RT-PCR : whose Target Sequences were Coding / Non-Coding Region of Each Following Thing -- F of Fusion Glycoprotein Gene of RSV -- 1 Subunit The 5'-non-coding region of the hemagglutinin neuraminidase gene of PIV-1, and a PIV-3 fusion-protein gene, The nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA of M.pneumoniae, The array of the 5' non-coding region where the nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA of C.pneumoniae and enterovirus were saved dramatically, Influenza A, the non-structure protein gene of B origin, and the hexyne gene of adenovirus. The array was chosen with the procedure indicated before (Paton et al., 1992; Karron et al., 1992; Fan and Henrickson, 1996; Rotbart, 1990; Gaydos et al., 1992; Van

Kuppeveld et al., 1992; Claas et al., 1992; Hierholzer et al., 1993). About adenovirus, the array of Probe A was used as the 2nd magnification primer instead of the primer 2 (Hierholzer, 1993). The reverse transcription (RT) reaction was presented with the nucleic-acid formulation of 5 thru/or 6 microl from a clinical sample in last volume 1 of 20 microl. : 50 mM Tris-HCl (pH 8.3) which performed for [ RT ] 60 minutes at 37 degrees C using the following buffer presentation, 75mM MgCl<sub>2</sub> and 10 mM (\*\*) Guanine deoxyriboside triphosphoric acid (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 0.2 mug/mul Hexa nucleotide mix (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 20 U RNasin (Promega, Madison, Wisconsin USA) It reaches. 10 U Moloney murine Leukemia virus reverse transcriptase (Eurogentec, Seraing, Belgium) .

After carrying out heat inactivation of the reverse transcriptase for 5 minutes at 90 degrees C, RT reaction mixture of 20 microl was used for multiplex [ in the inside of 80 microl of whole products 1 / PCR ] by all. A buffer presentation (RT buffer is not taken into consideration) 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001 % gelatin, 0.2 mM dATP, dCTP, dGTP, 0.2 mM dTTP, and 0.01 mM Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 1 muM (\*\*) Primer (Eurogentec, Seraing, Belgium) , and -- 5 U AmpliTaq-Gold Polymerase (Perkin-Elmer, Branchburg, NJ, USA) it was . : which performed PCR in PE9600 Thermocycler (Perkin, Elmer, Branchburg, NJ, USA) as following -- 94 degrees C -- 30-second denaturation (it sets in a cycle 1 and is 10 minutes), and 50 degrees C -- 30-second annealing and 72 degrees C -- 30-second expanding (it sets in a cycle 40 and is 7 minutes) -- 40 cycles.

As a negative control, the blank reagent containing H<sub>2</sub>O was used instead of the nucleic acid. As electropositive m-RT-PCR contrast, all the nucleus acids prepared from a virus and/or a bacteria stock were used.

[0024]

4. Prevention of carry-over contamination In order to prevent the carry-over contamination in a laboratory, all the reagents that paid the following attention and of which : purchase was done were subdivided. Preparation of an PCR reagent, the nucleic-acid extract from a clinical sample, and the magnification process were performed in three separate chambers. The chip (BIOzym, Hess, Oldendorf, safeseal-tip of Germany) equipped with a sealing filter was used for pipetting of the reagent introduced into PCR, and decontamination of all the area and equipment was carried out before and after pipetting by the sodium hypochlorite and Bacillol (alcohol of Germany a sexual feeling Bode Chemie, Hamburg, stain inhibitor).

[0025]

5. Agarose gel electrophoresis As it was indicated by Sambrook and others (Sambrook et al., 1989), separation according [ accord / at agarose gel / 130 volts ] to the electrophoresis of a PCT product (10 microl) at 160mA was performed 2% among the 0.5XTBE buffer (0.045M Tris-boric acid, 0.001M EDTA), and it dyed by the ethidium bromide, and the PCR product was visualized by UV irradiation. As fragmentation length contrast, MspI digestive pUC19 DNA of 0.6-0.8 microg was used as a marker.

[0026]

6. Microwell hybridization analysis This assay was performed using the PCR-ELISA system of Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). The PCR product of 5 microl was put into each nine well of the microtiter plate covered with streptavidin, and 0.2N NaOH of 25 microl was denatured by adding to each well. The hybridization buffer of 200 microl containing each prehension probe with which 2 pmol was biotin-ized was added after 5 minutes. The used prehension probe was specific to the amplified target sequence (refer to above), and enterovirus, Influenza A, Influenza B, PIV-1, adenovirus (probe B), and the probe to M.pneumoniae (Gpo1)

were the same as what was reported before (Rotbart, 1990; Claas et al., 1992; Van Kuppenveld et al., 1992; Hierholzer et al., 1993; Fan and Hendricksom, 1996). The array of the probe used to other things was 5'-AAA ATT CCA AAA GAG ACC GGC-3' (array number: 3) to 5 '-TCT TGC TAC CTT CTG TAC TAA-3' (array number: 2); and PIV-3 to 5 '-CCT GCA TTA ACA CTA AAT TC-3' (array number: 1); C.pneumonia to RSV. All prehension probes are formed into the 3'-biotin, and purchased them from Eurogentec (Seraing, Belgium). Prehension was performed at 37 degrees C for 1 hour, and the washing solution (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) of 200microl washed the well 4 times at the room temperature after that. 100 The anti-D IG-peroxidase (10 mU/ml, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) of 200microl diluted with the buffer containing mM Tris-HCl and 150 mM NaCl (pH 7.5) to 1/1000 was added to each well. The incubation of the plate was carried out at 37 degrees C for 30 minutes, and the washing solution washed the well 4 times. The ABTSR substrate solution (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) of 200microl was added, and the incubation of the well was carried out at 37 degrees C for 30 minutes. The optical density (OD) of 405nm was read with the DIAS reader (Dynatech Laboratories, Guernsey, Channel Islands) (reference filter 492nm). It was under 0.2OD unit, and all the negative control values were considered that actuation is effective when positive control was higher than 1.0OD unit. An PCR positivity or negative were distinguished as a cut-off OD value 0.5, and the sample was classified by comparing with the result of gel electrophoresis further. The sample which has reading of the beginning between 0.2 thru/or 0.5 was considered to be a borderline, and it classified that it was a positivity or negative only after the reexamination using a specific single primer set. Electropositive hybridization contrast was included in each microwell hybridization assay. They consisted of an PCR product originating in the positive control contained in m-RT-PCR.

[0027]

7. Management of data All the obtained data were managed in the Microsoft Access database. In the case of [ as a result of obtaining from all the available information about a patient, all diagnostic results, and m-RT-PCR-ELISA ] Influenzas A and RSV, this database contained the data of EIA.

[0028]

8. Bacteria and Stock of Virus :Enterovirus Also Kindly Provided with Stock of Bacteria and Virus Which were Used as Positive Control from the Following Man, Influenza A and Influenza B B.Schweiger and E.Schreier,;(Robert-Koch-Institute, Berlin) RSV, PIV-1 and PIV-3 KM.Edwards;(Vanderbilt University, Tennessee, USA) RSV-long, PIV-3 A.Strecker;(Institute for Virology, Bochum) M.pneumoniae, C.pneumoniae and adenovirus are R.Krausse and P.Rautenberg (Institute for Medical Microbiology, Kiel).

Although the virus in these samples or the exact number of bacterial was unknown, according to the mail of B.Schweiger and P.Rautenberg, it thought in at most 108 pieces/ml. The m-RT-PCR sequence dilution (every 10 times) of the nucleic acid prepared from these cultures was used as mold of magnification using m-RT-PCR and a single PURAMA set, and the preliminary test of sensibility was performed.

Since the information about the exact number of a virus and bacteria was not acquired, sufficient amount of presumed nucleic acids to produce a magnification product was calculated from the presumed particle number (108-piece [ml ] non-diluted sample). In order to detect the possible cross-reactivity between living things, the non-diluted nucleic acid of 1microl from each living thing was used for m-RT-PCR.

[0029]

Multiplex RT-PCR about result 1. bacteria and a virus nucleic acid It examined about the m-RT-PCR-ELISA method using the nucleic acid prepared from the stock solution indicated to the ingredient and the approach. On each lane, only the special magnification product of 1 was observed so that drawing 1 might show. the presumed size (it pneumoniae(s) C. --) of the magnification product 463 bp; M.pneumoniae, 277 bp; Influenza B and 249 bp; RSV, 239 bp; PIV-3, 205 bp; Influenza A, 190 bp; PIV-1, 179 bp; Enterovirus and 154 bp; Adenovirus and 134 bp were well in agreement with the fragsize calculated from agarose gel ( drawing 1 ). This suggests that m-RT-PCR produced the specific product. However, although Influenza A and size discernment of PIV-3 were difficult, this singularity was checked by only gel electrophoresis with the absorbance value acquired by PCR-ELISA trial. The primer which was not used is looked at by the gel lower part.

In order to evaluate the sensibility of m-RT-PCR, the serial dilution of the concentration virus stock solution was carried out every 10 times, the magnification product which examines using a specific primer pair and can be checked by looking on agarose gel was obtained, and these were investigated in PCR-ELISA. When the maximum number of each living thing which exists in the 1ml of the original stock solutions was assumed to be 108 pieces, the approach concerned was able to detect PIV-1 of the adenovirus DNA of one target sequence of M.neumoniae and one target sequence of C.pneumoniae, and ten copies and Enterovirus RNA, and 100 copies, PIV-3, Influenza A, Influenza B, and RSV-RNA in the similar m-RT-PCR reaction.

[0030]

2. Comparison with enzyme immunoassay (EIA) and m-RT-PCR-ELISA In order to acquire the information about the quality of m-RT-PCR-ELISA, we compared with the result obtained from Marketing EIA. Using this EIA, 940 clinical samples were examined about existence of Influenza A, and 1031 clinical samples were examined about existence of RSV. A result is summarized in a table 1. Coincidence of the net of the result obtained by PCR to the result obtained by EIA about RSV was 95% (the electronegative sample of 140 electropositive samples [ +891 ] in EIA = 100%). 25 samples were identified the RSV positivity by only PCR-ELISA, and 24 samples were identified the RSV positivity by only EIA. In the case of Influenza A, coincidence of the net of PCR to EIA was 98% (negative [ of the +887 positivities of 53 pieces in EIA ] = 100%), one sample was a positivity only by EIA, and 14 samples were positivities only by PCR ELISA.

[0031]

3. Result of m-RT-PCR-ELISA using clinical sample 1118 samples were examined by m-RT-PCR-ELISA in all. Drawing 2 shows the rate as a result of [ in a period ] the examined sample size and as a result of [ electropositive PCR ]. Sample size increased periodically during all cold periods (from November to April), and this had an increment and correlation of the number of electropositive PCR. The patient (n= 106) of the maximum number consulted in winter in February in 1996 / 1997, and at least one sort of microorganisms were detected by m-RT-PCR in the 48%. Reduction of the sample size in 1995 / 1996 winter was what is depended on the imperfect sample collection in the early stages of our trial. The result related with a different microorganism is shown in a detail at drawing 3 . A total of 723 samples (65%) were negative among the samples with which the trial was presented, and 395 samples (35%) were positivities about at least one sort of living things. 37.5% of a isolation object was RSV, 20.0% was Influenza A, 12.9% was adenovirus, 10.6% was enterovirus, 8.1% was M.pneumonoae, 4.3% was PIV-3, 3.5% was PIV-1, 2.8% was Influenza B, and 0.2% was C.pneumoniae (as opposed to electropositive m-RT-PCR-ELISA total). RSV and Influenza A were mainly detected from

December before May. Only one peak was observed about Influenza B and PIV-1 (from September, 1997 to December). (from February, 1997 to April) The infection by adenovirus and enterovirus, PIV-3, and M.pneumoniae was consistent through the period of a certain thing, and some of numbers were detected. C. pneumoniae was detected only once in January, 1997.

[0032]

Simultaneous detection of 4.2 sorts of living things In the case of 20, the concurrent infection by two sorts of living things became clear by m-RT-PCR (5% of 1.8 whole% or a whole electropositive sample). Simultaneous magnification with an adenovirus nucleic-acid array, and C.pneumoniae (one example), enterovirus (one example) and Influenzas A (one example) and RSV (five examples) arose. The double infection in which enterovirus was participating was detected with adenovirus (one example), Influenza A (three examples), Influenza B (one example), PIV-3 (three examples), M.pneumoniae (one example), and RSV (three examples). Furthermore, in one sample each, simultaneous magnification of the influenza B nucleic acid was carried out with RSV, and, moreover, simultaneous magnification of the M.pneumoniae nucleic acid was carried out with PIV-1 nucleic acid.

[0033]

5. Clinical data Among 1061 sample-patient pairs, although 861 pieces to clinical data were available, when one patient was hospitalized in the same hospital, the following sample or the subsequent sample was excepted in February, 1995. 550 persons were 0 thru/or 2 years old among these 861 patients, 153 persons were 2 thru/or 5 years old, and 158 persons were larger than 5 years old. Bacteria or the nucleic acid of a virus was not detected by m-RT-PCR in 62% of those samples. In research by this hospital, most diagnoses were pneumonia (309 examples or 36%). Pneumonia was most caused to usual by RSV (n= 59), Influenza A (n= 17), M.pneumoniae (n= 16), and adenovirus (n= 15). Enterovirus, PIV-3, PIV-1, and Influenza B related to the pneumonia of less than ten examples, respectively. In the case of 45, RSV was detected among 167 patients (19% of 861 samples) of wheeze bronchitis, adenovirus was detected in the case of 16, and enterovirus, Influenza A, Influenza B, PIV-1, PIV-3, and M.pneumoniae were detected in less than ten case, respectively. In all, bronchitis was observed in 95 patients (11% of 861 samples), and the detected living things were RSV (13 examples), enterovirus and Influenza A (four examples each), and adenovirus (three examples). 7.1 of 861 samples examined about detection of the microorganism by m-RT-PCR were diagnosed as rhinitis, 6.2% was diagnosed as the laryngotracheitis, and less than 5% was diagnosed as a pharyngitis, otitis media, tonsillitis, and the conjunctivitis, respectively. It diagnosed as the disease of everybody but a patient 9.1%.

The detection frequency of nine sorts of living things obtained by PCR about the disease of 1 is shown in drawing 4 . RSV related to pneumonia, wheeze bronchitis, bronchitis, otitis media, or a pharyngitis most usual. Influenza A related to many from 5% of the case of otitis media, tonsillitis, a pharyngitis, the laryngotracheitis, and pneumonia. Enterovirus is related \*\*\*\*\* to many in 5% of the case of tonsillitis and a pharyngitis. Adenovirus related to a pharyngitis, wheeze bronchitis, the conjunctivitis, and tonsillitis. M. Although pneumoniae related to pneumonia most usual, PIV-1 mainly related to the laryngotracheitis and PIV-3 related to the laryngotracheitis and the conjunctivitis. C. pneumoniae was detected only in only one bronchitis patient.

[0034]

Example 2: Design of the oligonucleotide probe for applying to application 1. LiPA of LIPA to acute sinopulmonary infection Good singularity and sensibility were obtained to a living thing

which is different when some of oligonucleotides used for the example are applied and it is used for LiPA assay (line probe assay, WO 94/12670). A table 3 summarizes the version which suited the different probe and different LiPA application over the already indicated living thing which was identified.

The deoxynucleotidyl transferase (Pharmacia) was used in the standard reaction buffer, and the Polytetrafluoroethylene (PTFE) was added to the optimized probe in enzyme. The reaction was stopped after the 1-hour incubation, the probe which attached the PTFE was settled, and it was washed by ice-cooling ethanol. It was made to dissolve by each concentration into 6X SSC, and the probe was applied to film Kataue as striping. As positive control, biotin-ized DNA was put in order together and applied. The oligonucleotide was fixed to the film by baking at 80 degrees C for 12 hours. Subsequently, the film was sliced to the 4mm piece.

[0035]

2. Preparation and PCR magnification of nucleic acid Bacteria and the culture stock of a virus were used as a reference ingredient. It was made the above-mentioned standard approach and the nucleic acid was extracted more.

By using a biotin-ized primer instead of setting the number of cycles to 35 and making digoxigenin-11-dUTP incorporate, except having performed the indicator of amplifier recon, as it already explained, the nucleic-acid formulation of 1 thru/or 5microl was used for multiplex RT-PCR.

[0036]

3. Quality of LiPA trial The biotin-ized PCR fragmentation and the denaturation solution (400mM NaOH/10mM EDTA) of this volume (5 thru/or 10microl) were mixed in the chamber, and the incubation was carried out at the room temperature for 5 minutes. Subsequently, 2ml (2xSSC/0.1% SDS) of hybridization solutions warmed at 50 degrees C was added, and, subsequently one piece per chamber was put in. It was [ sealing shaking ] under water bath, and hybridization was carried out in 50 degrees C for 1 hour. In the room temperature, the 2ml stringent washing solution (2xSSC/0.1% SDS) washed the piece twice for 20 seconds, and, subsequently it was washed at 50 degrees C for 15 minutes. It is the cone to turn two about a piece in Innogenetics standard rinse (solution RS) 2ml after this stringent washing. The incubation of the piece was carried out on the revolution plat form with the alkaline phosphatase indicator streptavidin conjugate, and it was diluted with the standard conjugate solution for 3 minutes in the room temperature. Subsequently, the piece was washed twice by 2ml RS, it was washed once by the substrate buffer (SB), and, subsequently to SB, the coloring reaction was made to start by adding BCIP and NBT. The coloring reaction was stopped by exchanging a coloring compound for distilled water after 30 minutes at a room temperature. It was made to dry and the piece was investigated immediately. The above-mentioned perfect procedure was also able to be transposed to the standard Inno-LiPA automation device (Auto-LiPA, Innogenetics, Zwijnaarde, Belgium). The separate band of the size expected about all trial living things according to the separation on 2% agarose gel of the amplifier recon obtained after multiplex RT-PCR performed about the reference ingredient was shown so that drawing 5 might show.

Drawing 6 shows the result of such amplifier recons by the LiPA piece, and the result of a negative control. These results show clearly that crossover hybridization is not seen between different living things which all Kataue's probes reacted specifically with the response amplifier recon, and were examined.

[0037]

4.C. Development of new probe for pneumonia, M pneumoniae, B.pertussis, and B.parapertussis

In order to transpose PUIRAIMA and the probe which were used for multiplex RT-PCR to the thing for detection of *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae*, the set of the new primer and probe which originate to a 16S-23S rRNA spacer field in these living things was developed. B. The primer and probe for specific detection of pertussis and *B. parapertussis*, or *B. bronchiseptica* were also developed, and it added to multiplex RT-PCR.

The primer of the 16S-23S rRNA spacer field origin for these bacteria pathogens and the array of a probe are summarized in a table 4.

The PCR experiment showed that amplifier recon was not obtained, when the nucleic acid originating in other infection venereal disease original objects with which all the selected primer sets were detected in the living thing or multiplex RT-PCR which amplified the response living thing array specifically and was related phyletically was used.

The 16S-23S rRNA spacer field of close species was most amplified to the object bacteria and them using the biotin-ized general-purpose primer originating in the three-dash terminal of 16S rRNA, and 5' parts of 23S rRNA.

0.1%, among SDS, 2xSSC(s) / all the selected probes reacted specifically with the object microorganism, and 50-degree C LiPA Kataue's hybridization showed that a cross reaction with the amplifier recon obtained from above-mentioned multiplex RT-PCR was not seen.

The first experiment used the primer and the probe (ribosome spacer origin) for multiplex RT-PCR, and showed that assay was extensible by adding the primer and probe for *Bordetella* sp. which participate in that the primer and probe which are used now can be transposed to the thing for *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae*, and sinopulmonary intection.

It is expected that this set is further extensible to a thing including the probe for other related pathogens like *Legionella pneumoniae* (a detail probe of the 16S-23S rRNA spacer field origin) from these results.

[0038]

Example 3: m-RT- and LiPA hybridization by the culture supernatant In order to check the correctness and the singularity of multiplex RT-PCR and LiPA hybridization, the culture (blinded cultures) to which LiPA assay was used for and the blind of many was carried out was analyzed.

1. According to explanation of a manufacturer, the nucleic acid of a culture supernatant was prepared using Boehringer-Mannheim "High Pure Viral Nucleic Acid Kit". m-RT-PCR included carrying out reverse transcription of the RNA of the RNA organism (RSV, PIV1, PIV3, InfA, InfB, enterovirus) origin, and carrying out PCR magnification of the DNA of Response DNA and adenovirus, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *B. pertussis*, and *B. parapertussis* like the above-mentioned example subsequently.

The primer was chosen from the already released target sequence which was saved dramatically. However, the primer used for magnification of a bacteria kind is [ *pneumoniae* / which is as follows / :*M. pneumoniae* / array number:17 and array number:19;C.] array number:22 and array number:23 about array number:20 and array number:21, and both *Bordetella* kinds.

[0039]

2. LiPA hybridization Hybridization of the PCR product of 5 thru/or 10microl was carried out to the LiPA piece containing a different specific probe for living things like the bacteria kind shown in the enterovirus shown in a table 3, Influenzas A and B, adenovirus, parainfluenza viruses, and a table 4. The probe used for RSV is shown in a table 5.

Hybridization was performed like the example 2 publication.

3. Result The result of the culture about 36 samples of the 1st series by which the blind was

carried out, and LiPA is compared, and it collects into a table 6.

In most cases, the result of LiPA was in agreement with the result of culture. In the case of two, existence of double infection became clear by multiplex trial, but only one of two sorts of living things which exist according to the result of culture was detected.

When an old culture supernatant is used, the result of obtained LiPA is negative and, probably will be based on disassembly of a nucleic acid.

In the 2nd experiment, the sample about culture of *Mycoplasma pneumoniae* by which the blind was carried out was evaluated using multiplex RT-PCR and subsequent LiPA hybridization. The result about 30 samples by which the blind was carried out is summarized in a table 7.

The result in a LiPA trial was in agreement with the result obtained in culture 100%.

[0040]

Table 1: Comparison with EIA and m-RT-PCR-ELISA [table 1]

RSV	EIA		
		陽性	陰性
PCR	陽性	116	25
	陰性	24	866
	合計	140	891

InfA	EIA		
		陽性	陰性
PCR	陽性	52	14
	陰性	1	873
	合計	53	887

[0041]

Table 2. Array en terrorism of primer used for example 1 - FP1: att gtc acc ata agc agc ca-3' en : terrorism - RP1: tcc tcc ggc ccc tga atg cg-3'MPN-FP1 : aag gac ctg caa ggg ttc gt-3'MPN-RP1 : ctc tag cca tta cct gct aa-3' influenza A-FP1:aag ggc ttt cac cga aga gg-3' influenza A-RP1:ccc att ctc att act gct tc-3' influenza B-FP1:atg gcc atc gga tcc tca ac-3' influenza B-RP1:tgt cag cta tta tgg agc tg -3' adenovirus - FP1: gcc gag aag ggc gtg cgc agg ta-3' adenovirus - RP1: atg act ttt gag gtg gat ccc atg ga-3'CPN-FP1 : tga caa ctg tag aaa tac agc-3'CPN-RP1 : cgc ctc tct cct ata aat-3'PIV1-FP1 : cac atc ctt gag tga tta agt ttg atg a-3'PIV1-RP1 : att tct gga gat gtc ccg tag gag aac-3'PIV3-FP1 : tag cag tat tga agt tgg ca-3'PIV3-RP1 : aga ggt caa tac caa caa cta-3'RSV-FP1 : tgt tat agg cat atc att ga-3' RSV-RP1:ttaacc agc aaa gtg tta ga-3' [0042]

[A table 2]



表 3.

生物	元のプローブ	適合バージョン*	名称**
エンテロウイルス インフルエンザ A インフルエンザ B アデノウイルス	gaaacacggacacccaaagta gtctcatcgaggacttgaatgaatgat gtcaagagacccgattatcac ctcgaatgacgcgcgggtgc	gaaacacggacacccaaagta (配列番号: 4) catcgaggacttgaatgg (配列番号: 5) gtcaagagacccgattatcac (配列番号: 6) gatgacgcgcgggtg (配列番号: 7) tctcgaatgacgcgcgg (配列番号: 8) cataaagaagggtgggc (配列番号: 9)	エンテロ 1 インフル a1 インフル b1 アデノ 1 アデノ 2 アデノ 3
パラインフルエンザ 1	tacctcattatcaatgglaagtcattatgat	cctcattatcaatggtaagtc (配列番号: 10) cctcattatcaatgggtatgc (配列番号: 11)	piv11 piv12
パラインフルエンザ 3	aaaattccaaaagagaccggc	gttagaytacctcattatcaattggt (配列番号: 12)	piv13
RSV	cctgcattacactaaattc	aaaattccaaaagagaccggc (配列番号: 13)	piv31
<i>M. pneumoniae</i>	actcctacgggaggcagcagta	cacctgcattacactaaattct (配列番号: 14)	rsv1
<i>C. pneumoniae</i>	tcttgctacccctctgtactaa	ctacgggaggcagcagcagt (配列番号: 15) tcttgctacccctctgtactaa (配列番号: 16)	mpn1 cpn1

\* y = c または t

\*\* 太字のプローブは第 1 世代の L i P A アッセイに使用したものである

[0043]

[A table 3]

表4. 16S-23S rRNAスペーサー領域由来のプライマーおよびプローブの配列

生物	プライマー*	プローブ
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FP1: ggtagatcacctcttctaatg (配列番号: 17) FP2: gtgtaaatataaaccaaatccc (配列番号: 18) RP: gcatccaccataagcccttag (配列番号: 19)	MPN3: ggtaaatataacccaatccct (配列番号: 24) MPN4: gaacattccgcttcttc (配列番号: 25) MPN5: gaacattccgcttcttcaa (配列番号: 26)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	FP: ccttttaaggacaaggagggtg (配列番号: 20) RP: gatcatgcaagtaactcaac (配列番号: 21)	CPN2: gcaagtatttatatccgcatt (配列番号: 27) CPN3: gtttcaaaacattcagtatatgac (配列番号: 28)
<i>Bordetella pertussis</i>	FP: tatagctgctggatcggtgg (配列番号: 22) RP: ccaaaacccacgccttaacac (配列番号: 23)	BP2: gcctgtccagaggatg (配列番号: 29) BPP1: cccgtctgaagatggg (配列番号: 30)
<i>Bordetella parapertussis/bronchiseptica</i>	同義語 <i>B. pertussis</i>	

\*: FP = 順方向プライマー; RP = 逆方向プライマー

[0044]

Table 5. Array of probe for RSV used for example 3 [table 4]

プローブ*	名称
tta aca trt aag tgc tta mag (配列番号 : 31)	rsv2
cct gca ttr aca cta aat tc (配列番号 : 32)	rsv6
cac ctg cat tra cac taa att c (配列番号 : 33)	rsv7
ctt aca cct gca ttr aca cta aat tc (配列番号 : 34)	rsv8

\* r = a or -- g and m = a or -- c [0045]

[A table 5]

Table 6. Result of culture about a series of 36 samples by which blind was carried out, and LiPA

標本	培養結果	LiPA 結果
1	アデノウイルス	アデノウイルス
2	アデノウイルス 4	アデノウイルス
3	アデノウイルス 4	アデノウイルス
4	アデノウイルス	エンテロウイルス + アデノウイルス
5	アデノウイルス	アデノウイルス
6	エコ タイプ 24 12374/97	エンテロウイルス
7	エコ タイプ 30 7682/97	エンテロウイルス
8	Inf A/WSN (H1N1) HA:1:1024	インフルエンザ A
9	Inf A/ホンコン HA:1:128	インフルエンザ A
10	Inf A/ショールペ/54 HA:1:256	インフルエンザ A
11	Inf B/ホンコン HA:1:64	インフルエンザ A + インフルエンザ B
12	Inf B/リー/40 HA:1:64	インフルエンザ B
13	Inf B/ペキン/6 HA:1:64	インフルエンザ B
14	Inf B/ビクトリア HA:1:64	インフルエンザ B
15	Inf A/ウーハン/371/95 HA:1:32	インフルエンザ A
16	Inf A/テキサス/36/91 HA:1:256	インフルエンザ A
17	Inf A/JHB/33/94 HA:1:256	陰性
18	Inf B/ハルビン/7/94 HA:1:32	インフルエンザ B
19	Inf A/ナンチャン/93/95 HA:1:64	インフルエンザ A
20	Inf B/シンガポール /6/86 HA:1:256	インフルエンザ B
21	PIV 2	陰性
22	PIV 2	陰性
23	PIV 2	陰性
24	血清学的 Inf A 陽性	陰性
25	血清学的 Inf A 陽性	陰性
26	コクサッキー タイプ B1	エンテロウイルス
27	コクサッキー タイプ B2	エンテロウイルス
28	コクサッキー タイプ B3	エンテロウイルス
29	コクサッキー タイプ B4	エンテロウイルス
30	コクサッキー タイプ B5	エンテロウイルス
31	コクサッキー タイプ B6	エンテロウイルス
32	コクサッキー タイプ A16	エンテロウイルス
33	エコ タイプ 6	エンテロウイルス
34	エコ タイプ 7	エンテロウイルス
35	エコ タイプ 11	エンテロウイルス
36	エコ タイプ 30 7682/97	エンテロウイルス

[0046]

Table 7. It is [a table 6] as a result of 30 samples about the culture of *Mycoplasma pneumoniae* by which the blind was carried out.

<i>M. pneumoniae</i>	LiPA 陽性	LiPA 陰性
Culture 陽性	17	0
Culture 陰性	0	13

[0047]

Reference Adcock, P.M., and G.G. Stout and M.A.Hauck, and G.S.Marshall. (1997) Effect of rapid viral diagnosis on the management of children hospitalized with lower respiratory tract infection. *J. Pediatric.Infect.Dis.* 16 : 842-846. Asseline U., Delarue M., and Lancelot G. and Toulme F. and Thuong N. Nucleic acid-binding molecules with high affinity and base sequence specificity (1984) : intercalating agents covalently linked to oligodeoxynucleotides. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 81 (11): 3297-301. Bartlett, J.G., and L.M.Mundy. (1995) Community-acquired pneumonia, *NEJM*, 333 : 1618 - 1624. Bej A. and Mahbubani M., Miller R., and Di Cesare J., Haff L., and Atlas R. Multiplex PCR (1990) amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. *Mol Cell Probes* 4:353-365. Claas, E.C.J., and M.J.W. Sprenger, G.E.M. Kleter, R. van Beek, W.G.V. Quint, and N. Masurel. (1992) Type-specific identification of influenza viruses A and B and C by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 39 : 1-13. Compton J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350: 91-92. Dixon and R.E.. (1985) Economic costs of respiratory infections in the United States. *Am.J.Med.* 78 () [ Suppl.] 6B : 45-51. Drews, A.L. and R.L. Atmar and W.P. Glezen and B.D. Baxter, P. A. Piedra and S.B. Greenberg . Dual respiratory (1997) virus infections. *Clin. Infect.Dis.* 25 : 1421 - 1429. Duck P. (1990) Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides. *Biotechniques* 9:142-147. Echevarria, J.E., D.D. Erdman, E.M. Swierkosz, and B.P. Holloway, L. J. Anderson. (1998) Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, and 3 from clinical samples by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36 : 1388-1391. Ellis and J.S., D. M. Fleming and M.C. Zambon. (1997) Multiplex reverse transcription-PCR for surveillance of influenza A and B viruses in England and Wales in 1995 and 1996. *J. Clin. Microbiol.* 35 : 2076 - 2082. Falck G. and J. Gnarpe and H. Gnarpe . Prevalence of (1997) *Chlamydia pneumoniae* in healthy children and in children with respiratory tract infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16 : 549-554. Fan and J. And K. Henrickson. (1996) Rapid diagnosis of human parainfluenza virus type 1 infection by quantitative reverse transcription-CPR-enzyme hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.* 34 : 1914-1917. Garenne, M , C. Ronsmans, H. Campbell (1992). The magnitude of-mortality-from-acute respiratory-infections in children under 5 years-in-developing countries. *World Health Stat. Q.* 45: 180 - 191. Gaydos, C.A., T.C. Quinn, and J.J. Eiden (1992). Identification-of *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 796-800. Gendrel, D., J. Raymond, and F. Moulin, J. L. Iniguez and S. Ravilly, F. Habib and P. Lebon, and G. Kalifa. (1997) Etiology and response to antibiotic therapy of community-acquired pneumonia in French

children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16 : 388-391. Gilbert, L. L., A. Dakhama, and B.M. Bone, E.E. Thomas, and R. G. Hegele. (1996) Diagnosis of viral respiratory tract infections in children by using a reverse transcription-PCR panel and *J. Clin. Microbiol.* 34 : 140-143. Goo and Y.A.M.K. Hori and J.H. Jr. Voorhies, C. C. Kuo and S.P. Wang, L. A. Campbell. (1995) Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in ear fluids from children with otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 14 : 1000-1001. Guatelli J., Whitfield K., Kwoh D., Barringer K., Richman D. and Gengeras T. Isothermal and in (1990) vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 1874-1878. Hassan-King, M., I. Baldeh, R. Adegbola, C. Omosigho, S.O. Usen, and A. Oparaugo, B. M. Greenwood. (1996) Detection of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* DNA in blood culture by a single PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 34 : 2030 - 2032. Hassan-King, M., R. Adegbola, and I. Baldeh and K. Mulholland, C. Omosigho, A. Oparaugo, and S. Usen, A. Palmer, and G. Schneider and O. Secka, M. Weber and B. Greenwood. A polymerase (1998) chain reaction for the diagnosis of *Haemophilus influenzae* type b disease in children and its evaluation during a vaccine trial. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17 : 309-312. Hemming, V.G.. (1994) Viral respiratory diseases in children : classification etiology and epidemiology and risk factors. *J. Pediatr.* 124 : S 13- 16. Hierholzer and J.C., P. E. Halonen and P.O. Dahlen, P.G. Bingham and M.M. McDonough. Detection of (1993) adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved fluoremetry and *J. Clin. Microbiol.* 31 : 1886-1891. Hinman and A.R.. (1998) Global progress in infectious diseases control. *Vaccine* 16: 1116-1121. Karron, R.A., K.L. O'Brien, J.L. Froehlich, and V.A. Brown (1992). Molecular epidemiology-of-a-parainfluenza type 3 virus outbreak on a pediatric ward. *J. Inf. Dis.* 167: 1441 - 1445. Kawasaki, E.S. (1990). Amplification of RNA. P 21-27 In M.A. Innis, D.H. Gelfand and J.J. Sninsky and T.J. White (ed.), *PCR protocols : A guide to methods and applications*. Academic Press. Kwoh D., Davis G., and Whitfield K., Chappelle H., and Dimichele L. and Gingeras T.. (1989) Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1173-1177. Kwok S., Kellogg D., and McKinney N., Spasic D., and Goda L. and Levenson C. and Sinisky J. (1990) Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucl. Acids Res.* 18 : 999. Landgren U., Kaiser R., and Sanders J. and Hood L. (1988) A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241: 1077-1080. Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M., Gallo, M.V., Chee, and M.S., Mittleman, M., and Wang, C., Kobayashi, M., and Horton, H. and Bown and E.L.. (1996) Expression monitoring by hybridisation to high density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology* 14 : 1675-1680. Lomeli H., Tyagi S., and Pritchard C. and Lisardi P. and Kramer F. (1989) Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes. *Clin Chem* 35: 1826-1831. Marx, A., and T.J. Torok, R.C. Holman, M.J. Clarke, and L.J. Anderson. (1997) Pediatric Hospitalizations for croup : (laryngotracheobronchitis) biennial increases associated with human parainfluenzavirus 1 epidemics. *J. Infect. Dis.* 176 : 1423-1427. Matsukura M., Shinozuka K., and Zon G., Mitsuya H., and Reitz M. and Cohen J. and Broder S. (1987) Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides : inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (21): 7706-10. Messmer, T.O., K. Skelton, J.F. Moroney, H. Daugharty, and B.S. Fields. (1997) Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 35 : 2043 - 2046. Miller P and Yano J, Yano E, and Carroll C, Jayaram K and Ts'o P (1979) Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside

methylphosphonates. *Biochemistry* 18 (23) : 5134 - 43. Mullis K., Faloona F., Scharf S. et al. Specific enzymatic amplification-of-DNA in vitro: the polymerase-chain-reaction (1986). *Gold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1: 263-273. Mullis K.B. and Faloona F.A. Specific synthesis-of-DNA-in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.(1987) *Methods Enzymol.* 155 : 335-350. Nielsen P. and Egholm M. and Berg R. and Buchardt O. (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254 (5037) : 1497-500. Nielsen P., Egholm M., and Berg R. and Buchardt O. (1993) Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA. *Nucl. Acids Res.* 21(2) : 197-200. Nohynek, H., J. Eskola, M. Kleemola, E. Jalonen, P. Saikku, and M. Leinonen. (1995) Bacterial antibody assays in the diagnosis of acute lower respiratory tract infection in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 14 : 478-484. Paton and A. W., J. C. Paton and A. J. Lawrence, P. N. Goldwater and R. J. Harris. (1992) Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 901-904. Reznikov, M., and T. K. Blackmore and J. J. Finlay-Jones and D. L. Gordon. (1995) Comparison of nasopharyngeal and throat swab specimens in a polymerase chain reaction-based test for *Mycoplasma pneumoniae*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14 : 58 - 61. Rotbart and H. A.. (1990) Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 438-442. Rotbart, H. A. and M. H. Sawyer and S. Fast, C. Lewinski, and N. Murphy and E. F. Keyser, J. Spadaro and S. Y. Kao, M. Loeffelholz. (1994) Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. *J. Clin. Microbiol.* 32 : 2590-2592. Saiki R. K., Bugawan T. L. and Horn G. T. et al. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. (1986) *Nature* 324 : 163-166. Saiki, R. K. and D. H. Gelfand, S. Stoffel and S. J. Scharf, R. Higuchi and G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. Primer-directed (1988) enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491. Saiki R. K., Walsh P. S., Levenson, C. H. and Erlich H. A. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized-sequence-specific-oligonucleotide probes (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6230-6234. Saiki, R. K. (1990). Amplification of genomic DNA, p 13-20. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (ed.) *PCR protocols : A guide to methods and applications*. Academic Press. Saikku, P.. (1997) Atypical respiratory pathogens. *Clin. Microbiol. Inf.* 3 : 599-604. Sambrook, J. and E. F. Fritsch and T. Maniatis. (1989) *Molecular cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY. Stauffer, F., H. Haber, A. Rieger, and R. Mutschlechner, P. Hasenberger and V. J. Tevere and K. K. Young. (1998) Genus level identification of mycobacteria from clinical specimens by using an easy-to-handle *Mycobacterium*-specific PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 36 : 614- 617. Stuyver L. and Rossau R. and Wyseur A. et al. Typing of hepatitis (1993) C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J. Gen. Virol.* 74 : 1093-1102. Trolfors, B. And B. A. Claesson. (1997) Childhood pneumonia : possibilities for aetiological diagnosis. *Bailliere's Clinical Paediatrics.* 5 : 71- 84. UNICEF.. (1993) Pneumonia, 3.5 millions deaths, *The State of the World's Children*. Valassina, and M. A. M. Cuppone and M. G. Cusi, P. E. Valensin. (1997) Rapid detection of different RNA respiratory virus species by multiplex RT-PCR: application to clinical specimens. *Clin. Diagn. Virol.* 8 : 227-232. Van Kuppeveld, F. J. M. van der Logt, A. F. Angulo and M. J. Van Zoest and W. G. V. Quint, H. G. M. Niesters, J. M. D. Galama, and W. J. G. Melchers. (1992) Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Env. Microbiol.* 58 : 2606-2615. Woo, P. C. and S. S. Chlu and W. H. Seto and M. Pelris. (1997) Cost-effectiveness of rapid diagnosis of viral respiratory tract infections in



pediatric patients. J.Clin.Microbiol.35 : 1579-1581. Wu D.and Wallace B.(1989) The ligation amplification reaction-(LAR) amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. Genomics 4:560-569. Yang S.Y. A standardised method for detection of HLA-A and HLA-B alleles by one-dimensional isoelectric focusing gel electrophoresis(IEF). Immunobiology of HLA. Histocompatibility testing 1987. (ed.B.Dupont) Springer-Verlag, New York, pp.332-335. [easy explanation of a drawing]

[Drawing 1] Drawing 1 shows the separation on the agarose gel of a m-RT-PCR product. The m-RT-PCR product of 10 microl was separated on 2% agarose gel. As indicated to the ingredient and the approach, m-RT-PCR was performed by using the virus of 1 microl, or a bacterial nucleic acid as mold. The die length of the product expected is indicated in the text. The size (base pair (bp)) of the DNA fragment (pUC19 of 0.7 microg digested by MspI) of a marker is as follows. : 1:501bp;2:404bp;3:331bp;4:242bp;5:190bp;6:147bp;7:110bp.

[Drawing 2] Drawing 2 shows the rate of an electropositive m-RT-PCR result. The electropositive number of m-RT-PCR results and the electropositive total number of samples are shown in the y-axis. The time amount graduation on a x axis is from November, 1995 to April, 1998.

[Drawing 3] Drawing 3 shows the frequency of the electropositive m-RT-PCR result in a clinical sample. The electropositive number of m-RT-PCR results about nine sorts of each living things is shown on the y-axis. The time amount graduation on a x axis is from November, 1995 to April, 1998.

[Drawing 4] Drawing 4 shows the percentage of the living thing which causes infection. The percent to all the living things that cause a disease shows the amount of the living thing which causes a respiratory illness. The living thing which was not used for the trial is not shown in drawing.

[Drawing 5] Drawing 5 shows the separation on 2% agarose gel of the amplifier recon obtained after multiplex-RT-PCR performed about the reference matter. The band of the size expected about all the examined living things is shown separately.

[Drawing 6] Drawing 6 shows the hybridization and the negative control of these amplifier recons and LiPA pieces. These results show clearly that all Kataue's probes react specifically with the amplifier recon corresponding to them. Crossover hybridization is not seen between examined different living things.

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-526088

(P2002-526088A)

(43) 公表日 平成14年8月20日 (2002. 8. 20)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テームト\* (参考)

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 Q 1/68

A 4 B 0 2 4

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 N 15/00

Z N A A 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願2000-574290(P2000-574290)  
 (86) (22) 出願日 平成11年9月22日 (1999. 9. 22)  
 (85) 翻訳文提出日 平成13年3月22日 (2001. 3. 22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP 99/07065  
 (87) 国際公開番号 WO 00/17391  
 (87) 国際公開日 平成12年3月30日 (2000. 3. 30)  
 (31) 優先権主張番号 98870203. 1  
 (32) 優先日 平成10年9月24日 (1998. 9. 24)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (E P)

(71) 出願人 イノジェネティックス・ナムローゼ・フェ  
 ンノートシャップ  
 INNOGENETICS N. V.  
 ベルギー、ペー-9052ヘント、テヒノロギ  
 ーバルク6番  
 (72) 発明者 ヘールト・ヤンネス  
 ベルギー、ペー-3010ルーヴェン、エー・  
 ファンホーレンベケラール23/1番  
 (72) 発明者 ハインツ・ヨーゼフ・シュミット  
 ドイツ連邦共和国デー-24113モルセー、  
 ボゲンカウクスヴェーク1アー番  
 (74) 代理人 弁理士 青山 稔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性気道感染 (A R I) を引き起こす微生物の同定

## (57) 【要約】

本発明は、下記の遺伝子領域：RSVの融合糖蛋白遺伝子のF1サブユニット、PIV-1の赤血球凝集素ノイラミニダーゼ遺伝子、PIV-3融合蛋白遺伝子の5'非コーディング領域、M. pneumoniaeの16S rRNA配列C. pneumoniaeの16S rRNA配列、エンテロウイルスの5'非コーディング領域、インフルエンザA由来の非構造蛋白遺伝子、インフルエンザB由来の非構造蛋白遺伝子、およびアデノウイルスのヘキソン遺伝子のそれぞれに由来する少なくとも1つのプライマーセットを含むプライマー混合物を用いることにより生物学的試料中に存在するいくつかの標的ヌクレオチド配列を同時増幅することを含む、急性気道感染の検出方法に関する。この多重RT-PCR法は1つの増幅工程にて下記の微生物：RSV、パラインフルエンザウイルス、M. pneumoniae、C. pneumoniae、エンテロウイルス、インフルエンザAおよびBならびにアデノウイルスの存在の決定を可能にするので、特に好ましい。また本発明は、上記検出を行うためのキットならびにそれに使用する個々のプローブおよびプライマーにも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の遺伝子領域：

RSVの融合糖蛋白遺伝子のF1サブユニット  
PIV-1の赤血球凝集素ノイラミニダーゼ遺伝子  
PIV-3融合蛋白遺伝子の5' 非コーディング領域  
M. pneumoniaeの16S rRNA配列  
C. pneumoniaeの16S rRNA配列  
エンテロウイルスの5' 非コーディング領域  
インフルエンザA由来の非構造蛋白遺伝子  
インフルエンザB由来の非構造蛋白遺伝子、および  
アデノウイルスのヘキソン遺伝子。

のそれぞれに由来する少なくとも1つのプライマーセットを含むプライマー混合物を用いることにより生物学的試料中に存在するいくつかの標的ヌクレオチド配列を同時増幅することを含む、急性気道感染の検出方法。

【請求項2】 該16S rRNAプライマーが、16S rRNA配列と23S rRNA配列との間のスペーサー領域に由来するプライマーに置き換えられている請求項1記載の方法。

【請求項3】 さらにB. pertussisおよびB. parapertussisを特異的に検出するための少なくとも1つのプライマーペアも使用される請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 該プライマーが表2または表4から選択されるものである請求項1ないし3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 引き続き、好ましくは表3、表4または表5から選択されるプローブを用いて該増幅生成物が検出される請求項1ないし4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 配列番号：17、18、19、20、21、22および23から選択されるプライマー。

【請求項7】 配列番号：5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、24、25、26、27、28、29、30、31、32、

33および34から選択されるプローブ。

【請求項8】 請求項1ないし4のいずれかに記載の方法を行うためのプライマーのセットを含む、急性気道感染を検出するためのキット。

【請求項9】 請求項5記載の方法を行うためのプローブのセットを含む、急性気道感染を検出するためのキット。

【請求項10】 固体支持体、好ましくはナイロン膜上の並行線として該プローブが適用される請求項9記載のキット。

【請求項11】 請求項6記載の少なくとも1つのプライマーを含む、急性気道感染を検出するためのキット。

【請求項12】 請求項7記載の少なくとも1つのプローブを含む、急性気道感染を検出するためのキット。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

本発明は微生物の検出、より詳細には急性気道感染の検出の分野に関する。

##### 【0002】

急性気道感染（ARI）は世界の小児の罹病および死亡の最もありふれた原因であり、発展途上国の小児の死亡の約30%はこれによる（Hinman et al., 1998）。先進国においてはまれにしか死亡を引き起こさないが、ARIに対しては莫大な直接的および間接的健康ケア費用が必要となる（Garenne et al., 1992; UNICEF, 1993; Dixon, 1985）。ARIの原因は広範な微生物を包含する。Streptococcus pneumoniae、Haemophilus influenzaeおよびMoraxella catarrhalis（Barlett and Mundy, 1995）は最も頻繁に見出される細菌である。通常には上部気道の共生生物は痰試料、鼻咽頭吸引物またはスワブに混入しているが、侵襲的手法（肺せん刺）を使用しなければ、上部気道サンプリングによってARIにおけるそれらの病因学的役割を証明することは困難である（Trolfors and Claesson, 1997; Nohynek et al., 1995）。

##### 【0003】

これらの細菌とは対照的に、呼吸器の症候を有する小児におけるMycoplasma pneumoniae、Chlamydia pneumoniaeの検出、ならびにウイルスの検出は、通常には急性感染の証拠と考えられている。これらの病原体を同定するための現在の方法は、細胞培養、迅速抗原検出アッセイ、血清学的方法（間接的）、ならびに最近ではPCRを包含する（Trolfors and Claesson, 1997; Saikku, 1997）。細胞培養法は特別な研究室を必要とし、費用、時間がかかり、きつい仕事である。迅速抗原アッセイは2～3の微生物（大部分の国においてインフルエンザAおよびRSV）にしか使用できない。通常には、血清学的方法是急性期から回復期に至る血液試料における抗体濃度上昇を調べる必要があり、よって、試験結果が得られるのが遅すぎて急性疾患の治療には適さない。現在、通常使用されるARIの微生物診断のための迅速な方法は利用不可能であるが、かかる試験の利用可能性は、程度の差こそあれ正確に適合した抗生物質での治療を可能にし、費用、副作用ならびに耐性の出現を抑制するであろう（Woo et al., 1997）。

PCR (Saiki et al., 1988) およびTR-PCRのごとき現在利用可能な核酸増幅法は臨床標本中のウイルスおよび細菌に由来する核酸を検出するための非常に感度の高い方法である。これらの増幅方法は呼吸器合胞体ウイルス (Panton et al., 1992) または*M. pneumoniae* (Van Kuppeveld et al., 1992) のごとき取り扱いの難しいあるいは「培養困難」な生物の検出に特に有利である。

ARIを診断するためのPCRおよびRT-PCRを用いた以前の研究は単一のウイルスまたは細菌の検出に重点を置いていた。しかしながら、結果が陰性である場合はいつも特別な病因論が確立できないことにより、および1種よりも多い生物が関与する同時感染を調べることができないことにより、単一の感染病原体に関する核酸増幅法の診断における有用性が限定されている。

病原体同時検出のための公表された多重PCRアッセイ (Hassan-King et al., 1996, 1998; Messmer et al., 1997) およびGilbert et al., (1996)により記載された呼吸器標本に対する多重RT-PCRパネルはそれぞれ欠点を有しており、検出された各微生物のアッセイ条件には時間がかかり、1の試料について数本の試験管を使用するものであり、よって、クロスコンタミネーションの危険性が増大する。

#### 【0004】

これらの制限を克服するための我々の戦略は、通常には小児の上部気道にコロニーを形成しないRNAウイルス (エンテロウイルス、インフルエンザAおよびBウイルス、パラインフルエンザウイルスタイプ1および3、呼吸器合胞体ウイルス)、DNAウイルス (アデノウイルス) および細菌 (*C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*) を包含する呼吸器病原体の同時検出を1日で可能にする多重TR-PCR (multiplex PCR) プロトコルを使用することである。

#### 【0005】

急性気道感染を検出するための方法およびキットを提供することが本発明の目的である。

より詳細には、急性気道感染を検出するための多重PCR法およびキットを提供することが本発明の目的である。

急性気道感染の検出に有用なプライマーおよびプローブを提供することも本発

明の目的である。

より詳細には、本発明は、下記の遺伝子領域：

RSVの融合糖蛋白遺伝子のF1サブユニット

PIV-1の赤血球凝集素ノイラミニダーゼ遺伝子

PIV-3融合蛋白遺伝子の5' 非コーディング領域

*M. pneumoniae*の16S rRNA配列

*C. pneumoniae*の16S rRNA配列

エンテロウイルスの5' 非コーディング領域

インフルエンザA由来の非構造蛋白遺伝子

インフルエンザB由来の非構造蛋白遺伝子、および

アデノウイルスのヘキソン遺伝子

のそれぞれに由来する少なくとも1つのプライマーセットを含むプライマー混合物を用いることにより生物学的試料中に存在するいくつかの標的ヌクレオチド配列を同時増幅することを含む、急性気道感染の検出方法に関する。

#### 【0006】

この多重RT-PCR法は、主に小児の気道に感染する下記微生物の存在の決定を1の増幅工程で可能にするので、この多重RT-PCR法が特に好ましい：

RSV、パラインフルエンザウイルス、*M. pneumoniae*、*C. pneumoniae*、エンテロウイルス、インフルエンザAおよびBならびにアデノウイルス。

別の具体例によれば、本発明は、上記領域に由来するプライマーペアを用いる多重RT-PCRを用いることによりヒトパラインフルエンザウイルス、インフルエンザAおよびB、RSVならびに少なくとも1つの下記微生物が検出される上記方法にも関する：*M. pneumoniae*、*C. pneumoniae*、エンテロウイルスまたはアデノウイルス。

別の具体例によれば、本発明は、上記領域に由来するプライマーペアを用いるRT-PCRを用いることによりヒトパラインフルエンザウイルス、インフルエンザAおよびB、RSVならびに少なくとも1つの下記微生物が検出される上記方法にも関する：*M. pneumoniae*、*C. pneumoniae*、エンテロウイルスまたはアデノウイルス。

好ましい具体例によれば、本発明は、16S rRNAおよび23S rRNA配列の間のスペーサー領域に由来するプライマーにより該16S rRNAプライマーが置き換えられた上記方法に関する。

別の具体例によれば、本発明は、B. pertussisおよびB. parapertussisを特異的に検出するためのさらに少なくとも1つのプライマーペアが使用される上記方法に関し、好ましくは該プライマーは16S rRNAおよび23S rRNA配列の間のスペーサー領域に由来するものである。

もう1つの具体例によれば、本発明は、上記プライマーが表2または表4から選択されるものである上記方法に関する。

もう1つの具体例によれば、本発明は、引き続いて該増幅生成物がプローブを用いて検出され、該プローブが好ましくは表3、表4または表5から選択されるものである上記方法に関する。

もう1つの具体例によれば、本発明は表2または表4から選択されるプライマーに関する。また本発明は上記方法におけるかかるプライマーの使用にも関する。また本発明は本発明のプライマーの製造方法にも関する。

もう1つの具体例によれば、本発明は表3、表4または表5から選択されるプローブに関する。また本発明は上記方法におけるかかるプローブの使用にも関する。また本発明は、本発明のプローブの製造方法にも関する。本発明のプライマーおよびプローブを後で詳述するように変化させることができる。

#### 【0007】

もう1つの具体例によれば、本発明は、上記方法を行うための上記プライマーのセットを含む、急性気道感染を検出するためのキットに関する。上記プライマーのほかに、かかるキットはプローブならびに増幅および所望によりハイブリダイゼーション反応を行うに必要なバッファーならびにキット説明書を含んでいてもよい。また本発明は、少なくとも1つの上記プローブを含む上記キットにも関する。

もう1つの具体例において、本発明は、上記方法を行うためのプローブのセットを含む、急性気道感染を検出するためのキットに関する。上記プローブのほかに、かかるキットはプライマーならびにハイブリダイゼーションおよび所望によ



り増幅反応を行うに必要なバッファーならびにキット説明書を含んでいてもよい。また本発明は、少なくとも1つの上記のプライマーを含む上記キットにも関する。

もう1つの具体例によれば、本発明は、上記プローブが固体支持体上に、好ましくはナイロン膜上に並行線状に適用される上記キット、好ましくはLiPAキットに関する（後で示す実施例参照）。

#### 【0008】

異なる手法を用いて本発明の方法を行うことができる。これらの手法は、増幅後に固体支持体に標的核酸を固定化すること、次いで標識オリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションを行うことを含んでいてもよい。別法として、プローブを固体支持体上に固定化してもよく、所望により増幅後に標識標的ポリ核酸を用いてハイブリダイゼーションを行ってもよい。この手法は逆ハイブリダイゼーションと呼ばれる。便利な逆ハイブリダイゼーション手法はラインプローブアッセイ（LiPA, Innogenetics, Belgium）である。このアッセイは、固体支持体片上に並行線として固定化されたオリゴヌクレオチドプローブを用いる。別法として、プローブが隊列または微小隊列形式となって存在していてもよい。プローブをこの隊列上にスポットすることができ、あるいは隊列上の別個の場所でin situ合成することができる（Lockhart et al., 1996）。上記の同時増幅される標的配列を検出するための他のいずれの手法も本発明によりカバーされることが理解されるはずである。かかる手法は当該分野で知られた配列決定法または他のアレイ法を包含しうる。

#### 【0009】

以下の定義および説明は本発明をよりよく理解することを可能するであろう。

分析すべき試料中の標的材料はDNAまたはRNAであってよく、例えば、ゲノムDNA、メッセンジャーRNAまたはこれらの増幅されたバージョンであってよい。本明細書においてこれらの分子を「ポリ核酸」ともいう。

試料からのRNAまたはDNAの単離によく知られた抽出および精製方法を陥ることができる（例えば、Sambrook et al., 1989中に示されている）。

本明細書の用語「プローブ」は、標的ポリ核酸に特異的にハイブリダイゼーシ

ョンするように設計された1本鎖オリゴヌクレオチドをいう。好ましくは、本発明のプローブは約5ないし50ヌクレオチドの長さであり、より好ましくは約10ないし25ヌクレオチドの長さである。特に好ましいプローブの長さは10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25ヌクレオチドである。本発明に使用されるヌクレオチドはリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドおよびイノシンまたは本質的にハイブリダイゼーション特性を変化させない修飾基を含むヌクレオチドのごとき修飾ヌクレオチドであってもよい。

#### 【0010】

用語「プライマー」は、コピーされる核酸鎖に相補的なプライマー伸長生成物の合成の開始点として作用する1本鎖オリゴヌクレオチド配列をいう。プライマーの長さおよび配列は、伸長生成物の合成を開始させるものでなくてはならない。好ましくは、プライマーは約5〜50ヌクレオチドの長さである。個々の長さおよび配列は必要なDNAまたはRNA標的の複雑さならびに温度およびイオン強度のごときプライマーの使用条件によるであろう。実験条件が適合したものであるかぎり、本発明のプライマーをプローブとして用いてもよく、あるいはその逆であってもよいことが理解されるはずである。

本明細書の表現「適当なプライマーペア」は、特定のポリ核酸フラグメントの特異的増幅を可能にするプライマーのペアをいう。

本明細書プローブまたはプライマーの「標的領域」は、プローブまたはプライマーが完全に相補的であるかあるいは部分的に相補的である（すなわち、ある程度のミスマッチがある）検出すべきポリ核酸中の配列である。ある場合には該標的配列の相補物も適当な標的配列であることが理解されるはずである。

ポリ核酸の標的領域に対するプローブの「特異的ハイブリダイゼーション」は、使用実験条件下において該プローブがこの標的領域の一部分または全領域と2本鎖を形成し、それらの条件下において分析すべき試料中に存在するポリヌクレオチドの他の領域とは該プローブが2本鎖を形成しないことを意味する。

ポリ核酸の標的領域に対するプライマーの「特異的ハイブリダイゼーション」は、増幅工程中に、使用実験条件下において該プライマーがこの標的領域の一部

分または全領域と2本鎖を形成し、それらの条件下において分析すべき試料中に存在するポリヌクレオチドの他の領域とは該プライマーが2本鎖を形成しないことを意味する。

#### 【0011】

正しい増幅を保証するために増幅プライマーが鋳型中の対応標的配列と正確に合致する必要はないという事実は文献において十分に示されている (Kwok et al., 1990)。しかしながら、プライマーがそれらの標的配列に対して完全には相補的でない場合、増幅されたフラグメントはプライマーの配列を有し、標的配列の配列を有しないであろうということを考慮すべきである。プライマーを選択された標識 (例えば、ビオチン) で標識してもよい。使用する増幅方法はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; Saiki et al., 1988)、リガーゼ連鎖反応 (LCR; Landgren et al., 1988; Wu & Wallace, 1989; Barany, 1991)、核酸配列に基づく増幅 (NASBA; Guatelli et al., 1990; Compton, 1991)、鎖置換増幅 (SDA; Duck, 1990) またはQ $\beta$ レプリカーゼを用いる増幅 (Lomeli et al., 1989) により、あるいは核酸増幅が可能な当該分野で知られた他の適当な方法のいずれであってもよい。

本明細書においてプローブおよびプライマー配列を1本鎖DNAオリゴヌクレオチドとして5' から3' 方向へと示す。以下に示すプローブをそのまま、あるいはそれらの相補形態として、あるいはそれらのRNA形態として (TがUに置き換わっている) 使用できることは当業者に明らかである。

#### 【0012】

必要ならば十分なヌクレアーゼを用いて対応ヌクレオチド配列をクローン化プラスミドから切り出し、次いで、例えば、分子量により分画することにより、対応ヌクレオチド配列を含むインサートを含有する組み換えプラスミドをクローン化することにより本発明のプローブを調製することができる。例えば、慣用的なホスホートリエステル法により本発明のプローブを化学合成することもできる。

プライマー、またはプローブとして使用されるオリゴヌクレオチドはホスホロチエート (Matsukura et al., 1987)、アルキルホスホロチエート (Miller et al., 1979) またはペプチド核酸 (Nielsen et al., 1991; Nielsen et al., 199

3) のときヌクレオチドアナログを含有していてもよく、あるいはそれよりなっていないてもよく、あるいは挿入剤 (Asseline et al., 1984) を含んでいてもよい。これらの修飾の導入は、ハイブリダイゼーション反応特性、ハイブリッド形成の可逆性、オリゴヌクレオチド分子の生物学的安定性等のように特徴に正の影響を与えるには有利であるかもしれない。

【0013】

用語「固体支持体」は、オリゴヌクレオチドプローブをカップリングさせることのできる基材をいうが、オリゴヌクレオチドプローブがそのハイブリダイゼーション特性を保持し、ハイブリダイゼーションのバックグラウンドレベルが低いままであることが条件となる。通常には、固体基材はマイクロタイタープレート (例えばDEIA法において使用)、膜 (例えば、ナイロンまたはニトロセルロース) または微小球 (ビーズ) またはチップである。膜への適用または固定化の前に、核酸を修飾して固定化を容易にし、あるいはハイブリダイゼーション効率を増加させることが便利であるかもしれない。かかる修飾はホモポリマーテイリング、脂肪族基、 $\text{NH}_2$  基、SH基、カルボキシル基のごとき異なる反応性の基とのカップリング、あるいはビオチン、ハプテンまたは蛋白とのカップリングを包含する。

【0014】

用語「標識」は標識核酸の使用を意味する。Saiki et al., (1988) または Bej et al., (1990) により説明されたように増幅のポリメラーゼ工程において標識ヌクレオチドを取り込ませることにより、あるいは標識プライマーを用いることにより、あるいは当業者に知られた他のいずれかの方法により標識を行ってもよい。標識の性質はアイソトープ性 ( $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$  等) であつても非アイソトープ性 (ビオチン、ジゴキシゲニン等) であつてもよい。

用語「生物学的試料」または「試料」は、例えば、DNAもしくはRNAを含む鼻咽頭吸引物、喉または鼻咽頭スワブ、鼻咽頭洗浄物または気管吸引物または他の気道試料をいう。

【0015】

所望特性を有するプローブを設計するために、当業者に知られた以下の有用な

指針を適用することができる。

本明細書にて説明するようにハイブリダイゼーション反応の程度および特異性が多くの因子により影響されるので、標的に対して完全に相補的であろうとなかろうと、それらの因子の1つまたはそれ以上を操作することは個々のプローブの正確な感度および特異性を決定することになるであろう。種々のアッセイ条件の重要性および影響を本明細書においてさらに説明する。

【プローブ：標的】核酸ハイブリッドの安定性をアッセイ条件に適合するように選択すべきである。長いA-T豊富配列を避け、C：G塩基対でハイブリッドを終了させ、適応な $T_m$ を有するようにプローブを設計することによりこれを行うことができる。長さおよびGC含量により最終アッセイが行われる温度よりも $T_m$ が約2～10℃高くなるようにプローブの始点および終点を選択する。プローブの塩基組成は重要である。なぜなら、G-C塩基対は水素結合によりA-T塩基対よりも熱安定性が高いからである。よって、高いG-C含量の相補的な核酸が関与するハイブリダイゼーションは熱安定性がより高い。

プローブ設計の際に、プローブが使用されるイオン強度およびインキュベーション温度のごとき条件も考慮すべきである。ハイブリダイゼーションの程度は反応混合物のイオン強度が増加するにつれて増加すること、ならびにハイブリッドの熱安定性はイオン強度の増加に伴って増加することが知られている。一方、水素結合を破壊するホルムアミド、尿素およびアルコール類のごとき化学試薬はハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを増加させるであろう。かかる試薬による水素結合の脱安定化は $T_m$ を大幅に低下させる可能性がある。一般的には、約10～50塩基の長さの合成オリゴヌクレオチドプローブの最適ハイブリダイゼーションは2本鎖の融解温度よりも約5℃低い場合に起こる。最適温度未満でのインキュベーションはミスマッチ塩基配列のハイブリダイゼーションを可能にし、それゆえ特異性が低下する。

高いストリンジェンシーの条件下においてのみハイブリダイゼーションするプローブが望ましい。高いストリンジェンシー条件下において、非常の相補的な核酸ハイブリッドのみが形成されるであろう。十分に相補性のないハイブリッドは形成されないであろう。したがって、アッセイ条件のストリンジェンシーは、ハ

イブリッドを形成する2つの核酸鎖の間に必要な相補性の量を決定する。標的核酸と形成されたハイブリッドと非標的核酸と形成されたハイブリッドとの間の安定性の差を最大にするようにストリンジェンシーの程度が選択される。

#### 【0016】

ハイブリダイゼーションを妨害する強力な内部構造を形成することが知られている標的DNAまたはRNA中の領域はあまり好ましくない。同様に、非常に自己相補性があるプローブも避けるべきである。上で説明したように、ハイブリダイゼーションは2つの1本鎖の相補的核酸の会合であり、水素結合した2本鎖を形成するものである。2つの鎖の一方がハイブリッド中に完全にまたは不完全に含まれる場合、それは新たなハイブリッドの形成にあまり関与できないであろうということは含義的である。十分な自己相補性がある場合には、あるタイプのプローブ分子中に形成された分子内および分子間ハイブリッドが存在する可能性がある。注意深くプローブを設計することによりかかる構造を回避することができる。目的配列の実質的な部分が1本鎖であるようにプローブを設計することにより、ハイブリダイゼーションの速度および程度を大幅に増大させることができる。コンピュータープログラムを用いてこのタイプの相互作用を検索することができる。しかしながら、ある種の例においては、このタイプの相互作用を回避することができないかもしれない。

標準的なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は実施例の材料および方法のセクションに開示してある。他の条件は、例えば、50℃において3X SSC（クエン酸ナトリウムセリリン）、20%脱イオン化FA（ホルムアミド）である。プローブの特異性および感度が維持される場合には、他の溶液（SSPE（リン酸ナトリウムセリリンEDTA）、TMAC（塩化テトラメチルアンモニウム）等）および温度を用いることもできる。必要な場合には、プローブの長さまたは配列をわずかに改変して、与えられた条件下で必要とされる特異性および感度を維持する必要がある。

#### 【0017】

用語「ハイブリダイゼーションバッファー」は、適当なストリンジェンシー条件下において、プローブと試料中に存在するポリ核酸との間、あるいはプローブ

と増幅生成物との間のハイブリダイゼーション反応を可能にするバッファーを意味する。

用語「洗浄溶液」は、適当なストリンジェンシー条件において形成されたハイブリッドの洗浄を可能にする溶液を意味する。

#### 【0018】

本発明を一般的に説明したが、下記実施例および図面を参照することにより本発明はさらに容易に理解されるであろう。実施例および図面は本発明の多雨ようおよび具体例を説明するためだけのものであり、本発明を限定するものと解釈してはならない。本明細書中で挙げたすべての文献を出典明示により本明細書に一体化させる。

#### 【0019】

##### 表の説明

表1は、m-RT-PCR-ELISAおよび市販EIA間の比較研究から得られた結果を示す。

表2は実施例1に使用したプライマー配列を示す。

表3は、すでに記載されている同定された生物に対する異なるプローブならびにLiPA用途に適合したバージョンをまとめたものである。

表4は、細菌病原体用の16S-23S rRNAスペーサー領域に由来するプライマーおよびプローブの配列をまとめたものである。

表5は実施例3に使用したRSV用のプローブの配列を示す。

表6は、実施例3にて行われた一連の36個のブラインドされた (blinded) 試料に関する培養およびLiPAの結果の比較を示す。

表7は、実施例3にて行われた多重RT-PCRおよびLiPAを用いた、Mycoplasma pneumoniaeの培養物に関する一連の30個のブラインドされた標本についての培養およびLiPAの結果の比較を示す。

#### 【0020】

##### 実施例

##### 実施例1

##### 略号

急性気道感染 (ARI) ; PCRと組み合わせた逆転写 (RT-PCR) ; 多重RT-PCR (m-RT-PCR) ; マイクロウェルハイブリダイゼーションアッセイと組み合わせたm-RT-PCR (m-RT-PCR-ELISA) ; インフルエンザウイルスタイプA (インフルエンザAまたはInfA) ; インフルエンザウイルスタイプB (インフルエンザBまたはInfB) ; パラインフルエンザウイルスタイプ1 (PIV-1) ; パラインフルエンザウイルスタイプ3 (PIV-3) ; 呼吸器合胞体ウイルス (RSV)

#### 【0021】

##### 材料および方法

##### 1. 患者の試料

1995年11月から1998年4月までの間に我々の施設に入院していたARIを有する小児から鼻咽頭吸引物を得た。診断は、肺炎、ぜん息気管支炎、気管支炎、喉頭気管炎（これは喉頭炎、喉頭-気管-気管支炎および（偽）クループを包含する）、咽頭炎、扁桃炎、鼻炎、結膜炎、中耳炎を包含し、病因のコンピュータによるディスチャージ診断データベースによった。標本の収集は最初の冬季（1995年11月から1996年4月まで）において完全でなかったが、1996年10月1日には95%以上完全であった。入院初日に標本を集め、研究室に直接運び、まず4℃に保存し、試験用に調製し、さらに後に使用するか長期保存するものは-70℃で保存した。適度の注意を払って試料を分配してコンタミネーションを回避し、酵素イムノアッセイ (EIA) (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) を用いるRSVおよびインフルエンザA抗原の検出にその一部分を直接使用した。次の部分をm-RT-PCR、次いで、アガロースゲル電気泳動に使用し、マイクロウェルハイブリダイゼーションアッセイにて詳細を調べた。

#### 【0022】

##### 2. 核酸の抽出

1995年11月から1997年7月までに受け取った試料を下記のごとく調製した。100μlの呼吸器標本を100μlの0.9% NaCl溶液で希釈したものから全核酸を得た。ドデシル硫酸ナトリウムを添加して最終濃度0.1



%とした。1体積の1:1フェノールクロロホルム混合物で1回、次いで、1体積のクロロホルムで1回核酸を抽出し、0.3M酢酸アンモニウムおよびエタノールで沈殿させた。核酸ペレットを乾燥させ、15 $\mu$ lのジエチルピロカルボン酸処理された2回蒸留水中に再懸濁した。1997年8月から1998年4月までに受け取った標本を、説明書に従ってBoehringerの“High Pure Viral Nucleic Acid Kit” (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を用いて調製した。

調製手順のコントロールは以下のごとし: 1の陰性試料(健康な人の痰)を5~10個の試料の各シリーズに付し、クロスコンタミネーションの可能性をモニターした。陰性対照において偽陽性である場合、臨床標本の別の部分を用いて当該シリーズ中のすべての陽性臨床試料についてm-RTPCRを繰り返した。培養から得た陽性対照(それぞれインフルエンザA、インフルエンザB、PIV-1、PIV-3またはRSV)を各試験に使用して調製手順の有効性を調べた。調製した試料を即座にm-RTPCRに使用し、残りを-70℃で保存した。

### 【0023】

#### 3. 多重RT-PCR

標的配列は下記のそれぞれのもののコーディング/非コーディング領域であった: RSVの融合糖蛋白遺伝子のF1サブユニット、PIV-1の赤血球凝集素ノイラミニダーゼ遺伝子、PIV-3融合蛋白遺伝子の5'-非コーディング領域、*M. pneumoniae*の16SリボソームRNAのヌクレオチド配列、*C. pneumoniae*の16SリボソームRNAのヌクレオチド配列、エンテロウイルスの非常に保存された5'非コーディング領域、インフルエンザAおよびB由来の非構造蛋白遺伝子ならびにアデノウイルスのヘキシシン遺伝子の配列。以前記載された手順により配列を選択した(Paton et al., 1992; Karron et al., 1992; Fan and Henrickson, 1996; Rotbart, 1990; Gaydos et al., 1992; Van Kuppeveld et al., 1992; Claas et al., 1992; Hierholzer et al 1993)。アデノウイルスに関しては、プローブAの配列を、プライマー2のかわりに第2増幅プライマーとして使用した(Hierholzer, 1993)。

臨床標本からの5ないし6 $\mu$ lの核酸調合物を、最終体積20 $\mu$ l中で逆転写

(RT) 反応に供した。下記バッファー組成を用いて 37℃ で 60 分間 RT を行った: 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM (各) デオキシヌクレオシド三リン酸 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), 0.2 μg/μl ヘキサヌクレオチドミックス (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 20 U RNasin (Promega, Madison, Wisconsin USA) および 10 U の Moloney murine 白血病ウイルス逆転写酵素 (Eurogentec, Seraing, Belgium)。

90℃ で 5 分間逆転写酵素を熱不活性化させた後、全部で 20 μl の RT 反応混合物を、全体積 80 μl 中での多重 PCR に使用した。バッファー組成 (RT バッファーを考慮せず) は 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001 % gelatin, 0.2 mM dATP, dCTP, dGTP, 0.2 mM dTTP, 0.01 mM ジゴキシゲニン-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 1 μM (各) プライマー (Eurogentec, Seraing, Belgium), および 5 U の AmpliTaq-Gold ポリメラーゼ (Perkin-Elmer, Branchburg, NJ, USA) であった。下記のごとく PE9600 Thermocycler (Perkin, Elmer, Branchburg, NJ, USA) にて PCR を行った: 94℃ で 30 秒変性 (サイクル 1 においては 10 分)、50℃ で 30 秒アニーリング、72℃ で 30 秒伸長 (サイクル 40 においては 7 分) を 40 サイクル。

陰性対照として、H<sub>2</sub>O を含有するブランク試薬を核酸のかわりに使用した。陽性 m-R T-PCR 対照として、ウイルスおよび/または細菌ストックから調製した全細胞核酸を使用した。

#### 【0024】

#### 4. 持ち越しコンタミネーションの防止

研究室内でのキャリーオーバーコンタミネーションを防止するために、下記の注意を払った: 購入したすべての試薬を小分けした。PCR 試薬の調製、臨床試料からの核酸抽出および増幅工程を 3 つの別個の部屋で行った。シーリングフィルターを装備したチップ (BIOzym, Hess, Oldendorf, Germany の safeseal-tip) を、PCR に導入する試薬のピペッティングに使用し、ピペッティングの前後にすべてのエリアおよび装置を次亜塩素酸ナトリウムおよび Bacillol (Bode Chemie, Hamburg, Germany のアルコール性感染防止剤) で脱コンタミネーションした。

# 【0025】

## 5. アガロースゲル電気泳動

Sambrookら (Sambrook et al., 1989) により記載されたようにして、0.5XTBEバッファー (0.045M Tris-硼酸、0.001M EDTA) 中、2%アガロースゲルにて、130ボルト、160mAで、PCT生成物 (10 $\mu$ l) の電気泳動による分離を行い、臭化エチジウムで染色し、UV照射によりPCR生成物を可視化した。フラグメント長対照としては、0.6~0.8 $\mu$ gのMspI消化pUC19 DNAをマーカーとして使用した。

# 【0026】

## 6. マイクロウェルハイブリダイゼーション分析

Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany) のPCR-ELISA系を用いてこのアッセイを行った。ストレプトアビジンで被覆したマイクロタイタープレートの9個のウェルそれぞれに5 $\mu$ lのPCR生成物を入れ、25 $\mu$ lの0.2N NaOHを各ウェルに添加することにより変性させた。5分後、2pmolの、ビオチン化された各捕捉プローブを含有する200 $\mu$ lのハイブリダイゼーションバッファーを添加した。使用した捕捉プローブは増幅された標的配列に特異的であり (上記参照)、エンテロウイルス、インフルエンザA、インフルエンザB、PIV-1、アデノウイルス (プローブB) およびM. pneumoniae (Gp1) に対するプローブは以前に報告されたものと同じであった (Rotbart, 1990; Claas et al., 1992; Van Kuppenveld et al., 1992; Hierholzer et al., 1993; Fan and Hendrickson, 1996)。他のものに対して使用したプローブの配列は、RSVに対して5'-CCT GCA TTA ACA CTA AAT TC-3' (配列番号: 1); C. pneumoniaeに対して5'-TCT TGC TAC CTT CTG TAC TAA-3' (配列番号: 2); およびPIV-3に対して5'-AAA ATT CCA AAA GAG ACC GGC-3' (配列番号: 3) であった。すべての捕捉プローブは3'-ビオチン化されており、それらをEurogentec (Seraing, Belgium) から購入した。37℃で1時間捕捉を行い、その後、室温にてウェルを200 $\mu$ lの洗浄溶液 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) で4回洗浄した。100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 7.5)を含有するバッファーで1/1000に希釈した200 $\mu$ lの抗-DIG-ペルオキシダーゼ (10

μU/ml, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を各ウェルに添加した。プレートを37℃で30分インキュベーションし、ウェルを洗浄溶液で4回洗浄した。200 μl の A B T S<sup>®</sup> 基質溶液 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を添加し、ウェルを37℃で30分インキュベーションした。405 nm の光学密度 (OD) を D I A S リーダー (Dynatech Laboratories, Guernsey, Channel Islands) にて読んだ (リファレンスフィルター 492 nm)。すべての陰性対照値が0.2 OD 単位未満であり、陽性対照が1.0 OD 単位よりも高い場合に、操作は有効と考えられた。カットオフ OD 値 0.5 として PCR 陽性または陰性を判別し、さらにゲル電気泳動の結果と比較することにより試料を分類した。0.2 ないし 0.5 の間の最初の読みを有する試料をボーダーラインと考え、特異的な単一のプライマーセットを用いる再試験後にのみ陽性または陰性であると分類した。陽性ハイブリダイゼーション対照を各マイクロウェルハイブリダイゼーションアッセイに含めた。それらは m-R T-P C R に含まれる陽性対照に由来する P C R 生成物からなっていた。

#### 【0027】

##### 7. データの管理

得られたすべてのデータを Microsoft Access データベース中で管理した。このデータベースは患者に関する利用可能なすべての情報ならびにすべての診断結果および m-R T-P C R-E L I S A から得た結果、そしてインフルエンザ A および R S V の場合には E I A のデータを含んでいた。

#### 【0028】

##### 8. 細菌およびウイルスのストック

陽性対照として使用した細菌およびウイルスのストックは下記の人から親切にも提供された：エンテロウイルス、インフルエンザ A およびインフルエンザ B は B. Schweiger and E. Schreier, (Robert-Koch-Institute, Berlin) ; R S V、P I V-1、P I V-3 は K. M. Edwards (Vanderbilt University, Tennessee, USA) ; R S V-long、P I V-3 は A. Strecker (Institute for Virology, Bochum) ; M. pneumoniae、C. pneumoniae、およびアデノウイルスは R. Krausse and P. Rautenberg (Institute for Medical Microbiology, Kiel)。

これらの試料中のウイルスまたは細菌の正確な数は不明であったが、B. SchweigerおよびP. Rautenbergの私信によれば多くとも $10^8$ 個/mlと考えられた。これらの培養物から調製した核酸のm-RT-PCR系列希釈物（10倍ずつ）を、m-RT-PCRおよび単一プライマーセットを用いる増幅の鋳型として使用して、感度の予備試験を行った。

ウイルスおよび細菌の正確な数についての情報が得られないので、増幅生成物を生じさせるに十分な推定核酸量を推定粒子数（ $10^8$ 個/ml未希釈試料）から計算した。生物間の可能な交差反応性を検出するために、各生物からの $1\mu\text{l}$ の未希釈核酸をm-RT-PCRに使用した。

【0029】

#### 結果

##### 1. 細菌およびウイルス核酸に関する多重RT-PCR

材料および方法に記載したストック溶液から調製した核酸を用いるm-RT-PCR-ELISA法について試験した。図1からわかるように、各レーンにおいて1の特別な増幅生成物のみが観察された。その増幅生成物の推定サイズ（C. pneumoniae, 463 bp; M. pneumoniae, 277 bp; インフルエンザ B, 249 bp; RS V, 239 bp; PIV-3, 205 bp; インフルエンザ A, 190 bp; PIV-1, 179 bp; エンテロウイルス, 154 bp; アデノウイルス, 134 bp）はアガロースゲルから計算したフラグメントサイズとよく一致した（図1）。このことは、m-RT-PCRが特異的な生成物を生じたことを示唆する。しかしながら、ゲル電気泳動のみによってはインフルエンザAおよびPIV-3のサイズ識別は困難であるが、PCR-ELISA試験により得られた吸光度値によりこの特異性が確認された。利用されなかったプライマーはゲル下部に見られる。

m-RT-PCRの感度を評価するために、濃縮ウイルスストック溶液を10倍ずつ系列希釈し、特異的プライマーペアを用いて試験してアガロースゲル上で視認しうる増幅生成物を得て、これらをPCR-ELISAにて調べた。元のストック溶液1ml中に存在する個々の生物の最大数を $10^8$ 個と仮定すると、当該方法は類似のm-RT-PCR反応においてM. pneumoniaeの1個の標的配列およびC. pneumoniaeの1個の標的配列、10コピーのアデノウイルスDNAお

よびエンテロウイルスRNA、100コピーのPIV-1、PIV-3、インフルエンザA、インフルエンザBおよびRSV-RNAを検出することができた。

#### 【0030】

#### 2. 酵素免疫アッセイ (EIA) とm-RT-PCR-ELISAとの比較

m-RT-PCR-ELISAの品質に関する情報を得るために、我々は、市販EIAから得られた結果と比較した。このEIAを用いて、940個の臨床標本をインフルエンザAの存在に関して試験し、1031個の臨床標本をRSVの存在に関して試験した。結果を表1にまとめる。RSVに関してEIAにより得られた結果に対するPCRにより得られた結果の正味の一致は95%であった (EIAにおける140個の陽性標本+891個の陰性標本=100%)。PCR-ELISAのみにより25個の標本がRSV陽性と同定され、EIAのみにより24個の標本がRSV陽性と同定された。インフルエンザAの場合、EIAに対するPCRの正味の一致は98%であり (EIAにおける53個の陽性+887個の陰性=100%)、EIAのみにより1個の標本が陽性であり、PCR-ELISAのみにより14個の標本が陽性であった。

#### 【0031】

#### 3. 臨床標本を用いたm-RT-PCR-ELISAの結果

全部で1118個の標本をm-RT-PCR-ELISAにより試験した。期間中の試験した標本数および陽性PCR結果の割合が図2からわかる。すべての寒い期間中 (11月から4月まで) に標本数が定期的に増加し、これは陽性PCR数の増加と相関関係があった。1996/1997年冬季において、最大数の患者 (n=106) が2月に受診し、その48%においてm-RT-PCRにより少なくとも1種の微生物が検出された。1995/1996年冬季における標本数の減少は我々の試験の初期における不完全な試料収集によるものであった。異なる微生物に関する結果を図3に詳細に示す。試験に供した試料のうち合計723個 (65%) の標本は陰性であり、395個 (35%) の標本は少なくとも1種の生物に関して陽性であった。単離体のうち37.5%がRSVであり、20.0%がインフルエンザAであり、12.9%がアデノウイルスであり、10.6%がエンテロウイルスであり、8.1%が*M. pneumoniae*であり、4.3%

がPIV-3であり、3.5%がPIV-1であり、2.8%がインフルエンザBであり、0.2%が*C. pneumoniae*であった（陽性m-RT-PCR-ELISA全数に対して）。12月から5月までの間は主にRSVおよびインフルエンザAが検出された。インフルエンザB（1997年2月から4月まで）およびPIV-1（1997年9月から12月まで）に関してはただ1つのピークが観察された。アデノウイルスおよびエンテロウイルス、PIV-3および*M. pneumoniae*での感染は数の多少はあるものの期間を通して一貫して検出された。*C. pneumoniae*は1997年1月において1回だけ検出された。

#### 【0032】

##### 4. 2種の生物の同時検出

20の症例において2種の生物による同時感染がm-RT-PCRにより明らかとなった（全体の1.8%あるいは陽性標本の5%）。アデノウイルス核酸配列と、*C. pneumoniae*（1例）、エンテロウイルス（1例）、インフルエンザA（1例）およびRSV（5例）との同時増幅が生じた。エンテロウイルスが関与していた二重感染がアデノウイルス（1例）、インフルエンザA（3例）、インフルエンザB（1例）、PIV-3（3例）、*M. pneumoniae*（1例）およびRSV（3例）とともに検出された。

さらにそのうえ、各1個の標本において、インフルエンザB核酸がRSVとともに同時増幅され、*M. pneumoniae*核酸がPIV-1核酸とともに同時増幅された。

#### 【0033】

##### 5. 臨床データ

1995年2月に1061個の試料-患者ペアのうち861個から臨床データが利用可能であったが、1人の患者が同じ病院に入院した場合、次の試料またはその後の試料は除外した。これらの861人の患者のうち、550人は0ないし2歳であり、153人は2ないし5歳であり、158人は5歳よりも大きかった。それらの標本の62%において、細菌またはウイルスの核酸はm-RT-PCRにより検出されなかった。この病院による研究において最も多い診断は肺炎であった（309例または36%）。最も通常には、肺炎はRSV（n=59）

、インフルエンザA (n=17)、M. pneumoniae (n=16) およびアデノウイルス (n=15) により引き起こされたものであった。エンテロウイルス、PIV-3、PIV-1 およびインフルエンザBはそれぞれ10例未満の肺炎に関連していた。ぜん鳴気管支炎の167人の患者(861個の標本の19%)のうち、45の症例においてRSVが検出され、16の症例においてアデノウイルスが検出され、エンテロウイルス、インフルエンザA、インフルエンザB、PIV-1、PIV-3 およびM. pneumoniaeがそれぞれ10未満の症例において検出された。全部で95人の患者(861個の標本の11%)において気管支炎が観察され、検出された生物はRSV(13例)、エンテロウイルスおよびインフルエンザA(各4例)、アデノウイルス(3例)であった。m-RT-PCRによる微生物の検出に関して試験した861個の標本のうち7.1%が鼻炎と診断され、6.2%が喉頭気管炎と診断され、5%未満がそれぞれ咽頭炎、中耳炎、扁桃炎および結膜炎と診断された。患者の9.1%が他の疾患と診断された。

1の疾病についてPCRで得られた9種の生物の検出頻度を図4に示す。RSVは肺炎、ぜん鳴気管支炎、気管支炎、中耳炎または咽頭炎に最も通常に関連していた。インフルエンザAは中耳炎、扁桃炎、咽頭炎、喉頭気管炎、肺炎の症例の5%よりも多くに関連していた。エンテロウイルスは扁桃炎、咽頭炎の症例の5%よりも多くに関連していた。アデノウイルスは咽頭炎、ぜん鳴気管支炎、結膜炎および扁桃炎に関連していた。M. pneumoniaeは肺炎に最も通常に関連していたが、PIV-1は主に喉頭気管炎に関連しており、PIV-3は喉頭気管炎および結膜炎に関連していた。C. pneumoniaeはたった1人の気管支炎患者においてのみ検出された。

#### 【0034】

実施例2：急性気道感染へのLiPAの適用

##### 1. LiPAに適用するためのオリゴヌクレオチドプローブの設計

実施例に使用したオリゴヌクレオチドのいくつかを適用して、LiPAアッセイ(ラインプローブアッセイ、WO94/12670)に使用した場合に異なる生物に対して良好な特異性および感度を得た。表3は、すでに記載されている同定された生物に対する異なるプローブならびにLiPA用途に適合したバージョン



ンをまとめたものである。

デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (Pharmacia) を標準反応バッファー中で使用して、最適化されたプローブにポリ-Tテイルを酵素的に付加した。1時間インキュベーション後、反応を停止させ、テイルを付したプローブを沈殿させ、氷冷エタノールで洗浄した。プローブを6X SSC中に個々の濃度で溶解させ、膜片上に横線として適用した。陽性対照としてビオチン化DNAと一緒に並べて適用した。80℃で12時間ペーキングすることによりオリゴヌクレオチドを膜に固定した。次いで、膜を4mmの片にスライスした。

#### 【0035】

### 2. 核酸の調製およびPCR増幅

細菌およびウイルスの培養ストックをリファレンス材料として使用した。上記の標準的方法にしより核酸を抽出した。

サイクル数を35とし、ジデオキシジエチル-11-dUTPを取り込ませるかわりにビオチン化プライマーを用いることによりアンプリコンの標識を行ったこと以外は、すでに説明したようにして、1ないし5μlの核酸調合物を多重RT-PCRに使用した。

#### 【0036】

### 3. LiPA試験の品質

同体積(5ないし10μl)のビオチン化PCRフラグメントおよび変性溶液(400mM NaOH/10mM EDTA)を試験槽中で混合し、室温で5分インキュベーションした。次いで、50℃に温めておいたハイブリダイゼーション溶液(2xSSC/0.1% SDS)2mlを添加し、次いで、1個の試験槽につき1個の片を入れた。密閉振盪水浴中で50℃において1時間ハイブリダイゼーションさせた。室温において2mlのストリンジェントな洗浄溶液(2xSSC/0.1% SDS)で片を20秒間、2回洗浄し、次いで、50℃で15分洗浄した。このストリンジェントな洗浄後、Innogenetics標準リンス溶液(RS)2mlで片を2回すすいだ。アルカリ性ホスファターゼ標識ストレプトアビジン抱合体とともに片を回転プラットフォーム上でインキュベーションし、室温において3分間、標準コンジュゲート溶液で希釈した。次いで、片を2mlの

RSで2回洗浄し、基質バッファー（SB）で1回洗浄し、次いで、BCIPおよびNBTをSBに添加することにより発色反応を開始させた。室温で30分後、発色化合物を蒸留水に交換することにより発色反応を停止させた。乾燥させてすぐに片を調べた。上記の完全な手順を標準Inno-LiPAオートメーションデバイス（Auto-LiPA, Innogenetics, Zwijnaarde, Belgium）に置き換えることもできた。

図5からわかるように、リファレンス材料に関して行った多重RT-PCR後に得られたアンプリコンの2%アガロースゲル上での分離により、すべての試験生物に関して予想されたサイズの別々のバンドが示された。

図6は、LiPA片によるこれらのアンプリコンの結果ならびに陰性対照の結果を示す。これらの結果は、片上のすべてのプローブがその対応アンプリコンと特異的に反応し、試験した異なる生物間において交差ハイブリダイゼーションが見られないことを明確に示す。

#### 【0037】

4. *C. pneumonia*, *M. pneumoniae*, *B. pertussis*および*B. parapertussis*用の新たなプローブの開発

多重RT-PCRに使用したプライマーおよびプローブを*M. pneumoniae*および*C. pneumonia*の検出用のものに置き換えるために、これらの生物用に16S-23S rRNAスペーサー領域に由来する新たなプライマーおよびプローブのセットを開発した。*B. pertussis*および*B. parapertussis*または*B. bronchiseptica*の特異的検出のためのプライマーおよびプローブも開発して多重RT-PCRに加えた。

これらの細菌病原体用の、16S-23S rRNAスペーサー領域由来のプライマーおよびプローブの配列を表4にまとめる。

PCR実験は、選択されたすべてのプライマーセットが対応生物配列を特異的に増幅し、系統発生的に関連した生物または多重RT-PCRにおいて検出された他の感染性病原体に由来する核酸を用いた場合にはアンプリコンが得られないことを示した。

16S rRNAの3'末端および23S rRNAの5'部分に由来するピオ

チン化汎用プライマーを用いて目的細菌およびそれらに最も近縁種の16S-23S rRNAスペーサー領域を増幅した。

2xSSC/0.1% SDS中、50℃でのLiPA片上のハイブリダイゼーションは、選択したすべてのプローブが目的微生物と特異的に反応し、上記多重RT-PCRから得られたアンプリコンとの交差反応が見られないことを示した。

最初の実験は、プライマーおよびプローブ（リボソームスペーサー由来）を多重RT-PCRに用いて、現在使用しているプライマーおよびプローブを*M. pneumoniae*および*C. pneumoniae*用のものに置き換えることができること、ならびに気道感染に関与する*Bordetella* sp.用のプライマーおよびプローブを加えることによりアッセイを拡張することができることを示した。

これらの結果から、さらにこのセットを*Legionella pneumoniae*のごとき他の関連病原体用のプローブ（より詳細には16S-23S rRNAスペーサー領域由来のプローブ）を含めたものに拡張できると予期される。

#### 【0038】

実施例3：培養上清によるm-RT-およびLiPAハイブリダイゼーション

多重RT-PCRおよびLiPAハイブリダイゼーションの正確さおよび特異性をチェックするために、LiPAアッセイを用いて多くのブラインドされた培養 (blinded cultures) を分析した。

1. 製造者の説明に従ってBoehringer-Mannheim "High Pure Viral Nucleic Acid Kit"を用いて培養上清の核酸の調製を行った。m-RT-PCRは、RNA生物 (RSV、PIV1、PIV3、InfA、InfB、エンテロウイルス) 由来のRNAを逆転写すること、次いで、上記実施例と同様にして対応DNAならびにアデノウイルス、*M. pneumoniae*、*C. pneumoniae*、*B. pertussis*および*B. paraptussis*のDNAをPCR増幅することを含んでいた。

すでに公表されている非常に保存された標的配列からプライマーを選択した。ただし、細菌種の増幅に使用したプライマーは下記のものである：

*M. pneumoniae*については配列番号：17および配列番号：19；*C. pneumoniae*については配列番号：20および配列番号：21、両方の*Bordetella*種について

は配列番号：22および配列番号：23。

【0039】

2. LiPAハイブリダイゼーション

表3に示すエンテロウイルス、インフルエンザAおよびB、アデノウイルスおよびパラインフルエンザウイルス、ならびに表4に示す細菌種のごとき異なる生物用の特異的プローブを含有するLiPA片に5ないし10 $\mu$ lのPCR生成物をハイブリダイゼーションさせた。RSVに使用したプローブを表5に示す。

実施例2記載のごとくハイブリダイゼーションを行った。

3. 結果

第1シリーズの36個のブラインドされた試料に関する培養およびLiPAの結果を比較して表6にまとめる。

大部分の場合においてLiPAの結果は培養の結果と一致した。2つの場合において、多重試験により二重感染の存在が明らかとなったが、培養の結果によれば存在する2種の生物のうち1つだけが検出された。

古い培養上清を用いた場合、得られたLiPAの結果は陰性であり、おそらく核酸の分解によるものであろう。

第2の実験において、多重RT-PCRおよびその後のLiPAハイブリダイゼーションを用いてMycoplasma pneumoniaeの培養に関するブラインドされた試料を評価した。30個のブラインドされた試料についての結果を表7にまとめる。

LiPA試験における結果は培養において得られた結果と100%一致した。

【0040】

表1: EIAとm-RT-PCR-EISAとの比較

【表1】

RSV	EIA		
		陽性	陰性
PCR	陽性	116	25
	陰性	24	866
	合計	140	891

InfA	EIA		
		陽性	陰性
PCR	陽性	52	14
	陰性	1	873
	合計	53	887

#### 【0041】

表2. 実施例1に使用したプライマーの配列

エンテロ-FP1: att gtc acc ata agc agc ca-3'  
 エンテロ-RP1: tcc tcc ggc ccc tga atg cg-3'  
 MPN-FP1: aag gac ctg caa ggg ttc gt-3'  
 MPN-RP1: ctc tag cca tta cct gct aa-3'  
 インフルエンザA-FP1: aag ggc ttt cac cga aga gg-3'  
 インフルエンザA-RP1: ccc att ctc att act gct tc-3'  
 インフルエンザB-FP1: atg gcc atc gga tcc tca ac-3'  
 インフルエンザB-RP1: tgt cag cta tta tgg agc tg-3'  
 アデノ-FP1: gcc gag aag ggc gtg cgc agg ta-3'  
 アデノ-RP1: atg act ttt gag gtg gat ccc atg ga-3'  
 CPN-FP1: tga caa ctg tag aaa tac agc-3'  
 CPN-RP1: cgc ctc tct cct ata aat-3'  
 PIV1-FP1: cac atc ctt gag tga tta agt ttg atg a-3'  
 PIV1-RP1: att tct gga gat gtc ccg tag gag aac-3'  
 PIV3-FP1: tag cag tat tga agt tgg ca-3'  
 PIV3-RP1: aga ggt caa tac caa caa cta-3'  
 RSV-FP1: tgt tat agg cat atc att ga-3'  
 RSV-RP1: tta acc agc aaa gtg tta ga-3'

#### 【0042】

表 3.

生物	元のプローブ	適合バージョン*	名称**
エンデロウイルス インフルエンザ A インフルエンザ B アデノウイルス	gaaacacggacacccaaagta gtctcatcgaggagactgaatgaatgat gtcaagagacacccgattatcac ctcgatgacgcgcggtgc	gaaacacggacacccaaagta (配列番号: 4) catcgaggactgaatgg (配列番号: 5) gtcaagagacacccgattatcac (配列番号: 6) gatgacgcgcggtg (配列番号: 7) tctcgatgacgcgcg (配列番号: 8) cataaagaagggtgggc (配列番号: 9)	エンデロ 1 インフル a1 インフル b1 アデノ 1 アデノ 2 アデノ 3
パラインフルエンザ 1	tacctcattatcaattgtaagtaatatatg	ccttcattatcaattgtaagtc (配列番号: 10) ccttcattatcaattggtatgc (配列番号: 11) gttagaytaccttcattatcaattggt (配列番号: 12)	piv11 piv12 piv13
パラインフルエンザ 3 RSV	aaaattccaaaagagacccggc cctgcattacactaaattc	aaaattccaaaagagacccggc (配列番号: 13) cacctgcattacactaaattct (配列番号: 14)	piv31 rsv1
<i>M. pneumoniae</i> <i>C. pneumoniae</i>	actcctacgggagcagcagta tctgtctacctctctgactaa	ctacgggagcagcagcagt (配列番号: 15) tctgtctacctctctgactaa (配列番号: 16)	mpn1 cpn1

\* y = c または t

\*\* 太字のプローブは第 1 世代の L i P A アッセイに使用したものである

表4. 16S-23S rRNAスペーサー領域由来のプライマーおよびプロープの配列

生物	プライマー*	プロープ
Mycoplasma pneumoniae	FP1: ggtagatcacctcttcttaag (配列番号: 17) FP2: gtgtaaatataaaccaatccc (配列番号: 18) RP: gcatccaccataagcccttag (配列番号: 19)	MPN3: ggtaattaaacccaatccct (配列番号: 24) MPN4: gaacatttcgctctttc (配列番号: 25) MPN5: gaacatttcgctcttcttcaa (配列番号: 26)
Chlamydia pneumoniae	FP: ccttttaaggacaaggaagggtg (配列番号: 20) RP: gatcatgcaagtaacttcacc (配列番号: 21)	CPN2: gcaagtattttatattccgcat (配列番号: 27) CPN3: gtttcaaaacattcagtatatgaic (配列番号: 28)
Bordetella pertussis	FP: tatagctgctggatcgggtg (配列番号: 22) RP: ccaaaacccaacgccttaacac (配列番号: 23)	BP2: gccgtccagaggatg (配列番号: 29) BPP1: ccgctctgaagatggg (配列番号: 30)
Bordetella parapertussis/bronchiseptica	同義語 B. pertussis	

\*: FP = 順方向プライマー; RP = 逆方向プライマー

表 5. 実施例 3 に使用した R S V 用プローブの配列

【表 4】

プローブ*	名称
tta aca trt aag tgc tta mag (配列番号 : 31)	rsv2
cct gca ttr aca cta aat tc (配列番号 : 32)	rsv6
cac ctg cat tra cac taa att c (配列番号 : 33)	rsv7
ctt aca cct gca ttr aca cta aat tc (配列番号 : 34)	rsv8

\* r = a または g, m = a または c

【 0 0 4 5】

【表 5】

表 6. 一連の 3 6 個のブラインドされた試料に関する培養および L i P A の結果



標本	培養結果	LiPA 結果
1	アデノウイルス	アデノウイルス
2	アデノウイルス 4	アデノウイルス
3	アデノウイルス 4	アデノウイルス
4	アデノウイルス	エンテロウイルス + アデノウイルス
5	アデノウイルス	アデノウイルス
6	エコ タイプ 24 12374/97	エンテロウイルス
7	エコ タイプ 30 7682/97	エンテロウイルス
8	Inf A/WSN (H1N1) HA:1:1024	インフルエンザ A
9	Inf A/ホンコン HA:1:128	インフルエンザ A
10	Inf A/ショーペ/54 HA:1:256	インフルエンザ A
11	Inf B/ホンコン HA:1:64	インフルエンザ A + インフルエンザ B
12	Inf B/リー/40 HA:1:64	インフルエンザ B
13	Inf B/ペキン/6 HA:1:64	インフルエンザ B
14	Inf B/ビクトリア HA:1:64	インフルエンザ B
15	Inf A/ウーハン/371/95 HA:1:32	インフルエンザ A
16	Inf A/テキサス/36/91 HA:1:256	インフルエンザ A
17	Inf A/JHB/33/94 HA:1:256	陰性
18	Inf B/ハルビン/7/94 HA:1:32	インフルエンザ B
19	Inf A/ナンチャン/93/95 HA:1:64	インフルエンザ A
20	Inf B/シンガポール/6/86 HA:1:256	インフルエンザ B
21	PIV 2	陰性
22	PIV 2	陰性
23	PIV 2	陰性
24	血清学的 Inf A 陽性	陰性
25	血清学的 Inf A 陽性	陰性
26	コクサッキー タイプ B1	エンテロウイルス
27	コクサッキー タイプ B2	エンテロウイルス
28	コクサッキー タイプ B3	エンテロウイルス
29	コクサッキー タイプ B4	エンテロウイルス
30	コクサッキー タイプ B5	エンテロウイルス
31	コクサッキー タイプ B6	エンテロウイルス
32	コクサッキー タイプ A16	エンテロウイルス
33	エコ タイプ 6	エンテロウイルス
34	エコ タイプ 7	エンテロウイルス
35	エコ タイプ 11	エンテロウイルス
36	エコ タイプ 30 7682/97	エンテロウイルス

【0046】

表 7. *Mycoplasma pneumoniae* の培養物に関する 30 個のブラインドされた標本の結果

【表 6】

M. pneumoniae	LiPA 陽性	LiPA 陰性
Culture 陽性	17	0
Culture 陰性	0	13

【0047】

文献

- Adcock, P.M., G.G. Stout, M. A. Hauck, and G.S. Marshall (1997). Effect of rapid viral diagnosis on the management of children hospitalized with lower respiratory tract infection. J. Pediatric. Infect. Dis. 16: 842-846.
- Asseline U., Delarue M., Lancelot G., Toulme F. and Thuong N. (1984) Nucleic acid-binding molecules with high affinity and base sequence specificity : intercalating agents covalently linked to oligodeoxynucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(11):3297-301.
- Bartlett, J.G., and L.M. Mundy (1995). Community-acquired pneumonia, NEJM, 333: 1618 - 1624.
- Bej A., Mahbubani M., Miller R., Di Cesare J., Haff L., Atlas R. (1990) Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. Mol Cell Probes 4:353-365.
- Claas, E.C.J., M.J.W. Sprenger, G.E.M. Kleter, R. van Beek, W.G.V. Quint, and N. Masurel (1992). Type-specific identification of influenza virus es A, B and C by the polymerase chain reaction. J. Virol. Meth. 39: 1 - 13.
- Compton J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. Nature 350: 91-92.
- Dixon, R.E. (1985). Economic costs of respiratory infections in the Unit

- ed States. Am. J. Med. 78 (Suppl. 6B) : 45 - 51.
- Drews, A. L., R. L. Atmar, W.P. Glezen, B.D. Baxter, P.A. Piedra, S.B. Greenberg (1997). Dual respiratory virus infections. Clin. Infect. Dis. 25: 1421 - 1429.
- Duck P. (1990) Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides. Biotechniques 9: 142-147.
- Echeviarra, J.E., D.D. Erdman, E.M. Swierkosz, B.P. Holloway, L.J. Anderson (1998). Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, and 3 from clinical samples by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 36: 1388 - 1391.
- Ellis, J.S., D.M. Fleming and M.C. Zambon (1997). Multiplex reverse transcription-PCR for surveillance of influenza A and B viruses in England and Wales in 1995 and 1996. J. Clin. Microbiol. 35: 2076 - 2082.
- Falck G., J. Gnärpe, and H. Gnärpe (1997). Prevalence of Chlamydia pneumoniae in healthy children and in children with respiratory tract infections. Pediatr. Infect. Dis. J. 16: 549 - 554.
- Fan, J. And K. Henrickson (1996). Rapid diagnosis of human parainfluenza virus type 1 infection by quantitative reverse transcription-CPR-enzyme hybridization assay. J. Clin. Microbiol. 34 : 1914 - 1917.
- Garenne, M., C. Ronsmans, H. Campbell (1992). The magnitude of mortality from acute respiratory infections in children under 5 years in developing countries. World Health Stat. Q. 45: 180 - 191.
- Gaydos, C.A., T.C. Quinn, and J.J. Eiden (1992). Identification of Chlamydia pneumoniae by DNA amplification of the 16S rRNA gene. J. Clin. Microbiol. 30: 796 - 800.
- Gendrel, D., J. Raymond, F. Moulin, J.L. Iniguez, S. Ravilly, F. Habib, P. Lebon, and G. Kalifa (1997). Etiology and response to antibiotic therapy of community-acquired pneumonia in French children. Eur. J. Clin. Mi

crobiol. Infect. Dis. 16: 388 - 391.  
 Gilbert, L.L., A. Dakhama, B.M. Bone, E.E. Thomas, and R.G. Hegele (1996).  
 ). Diagnosis of viral respiratory tract infections in children by using  
 a reverse transcription-PCR panel, J. Clin. Microbiol. 34: 140 - 143.  
 Goo, Y.A.M.K. Hori, J.H. Jr. Voorhies, C.C. Kuo, S.P. Wang, L.A. Campbell  
 1 (1995). Failure to detect Chlamydia pneumoniae in ear fluids from chil-  
 dren with otitis media. Pediatr. Infect. Dis. J. 14: 1000 - 1001.  
 Guatelli J., Whitfield K., Kwok D., Barringer K., Richman D. and Genger  
 as T. (1990) Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a mu-  
 ltienzyme reaction modeled after retroviral replication. Proc. Natl. Aca-  
 d. Sci. USA 87: 1874-1878.  
 Hassan-King, M., I. Baldeh, R. Adegbola, C. Omosigbo, S.O. Usen, A. Opar-  
 augo, B.M. Greenwood (1996). Detection of Haemophilus influenzae and Str-  
 eptococcus pneumoniae DNA in blood culture by a single PCR assay. J. Cli-  
 n. Microbiol. 34: 2030 - 2032.  
 Hassan-King, M., R. Adegbola, I. Baldeh, K. Mulholland, C. Omosigbo, A.  
 Oparaugo, S. Usen, A. Palmer, G. Schneider, O. Secka, M. Weber, B. Green-  
 wood (1998). A polymerase chain reaction for the diagnosis of Haemophilu-  
 s influenzae type b disease in children and its evaluation during a vacc-  
 ine trial. Pediatr. Infect. Dis. J. 17: 309 - 312.  
 Hemming, V. G. (1994). Viral respiratory diseases in children : classifi-  
 cation etiology, epidemiology and risk factors. J. Pediatr. 124: S 13 -  
 16.  
 Hierholzer, J.C., P.E. Halonen, P.O. Dahlen, P. G Bingham, M.M. McDonoug-  
 h (1993). Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase ch-  
 ain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved  
 fluoremetry, J. Clin. Microbiol. 31: 1886 - 1891.  
 Hinman, A.R. (1998). Global progress in infectious diseases control. Vac-  
 cine 16: 1116 - 1121.

- Karron, R.A., K.L. O'Brien, J.L. Froehlich, and V.A. Brown (1992). Molecular epidemiology of a parainfluenza type 3 virus outbreak on a pediatric ward. *J. Inf. Dis.* 167: 1441 - 1445.
- Kawasaki, E.S. (1990). Amplification of RNA. P 21-27 In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (ed.), *PCR protocols : A guide to methods and applications*. Academic Press.
- Kwoh D., Davis G., Whitfield K., Chappelle H., Dimichele L. and Gingeras T. (1989). Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1173-1177.
- Kwok S., Kellogg D., McKinney N., Spasic D., Goda L., Levenson C. and Sninsky J. (1990) Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucl. Acids Res.* 18: 999.
- Landgren U., Kaiser R., Sanders J. and Hood L. (1988) A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241:1077-1080.
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittleman, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H. and Bown, E.L. (1996). Expression monitoring by hybridisation to high density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology* 14: 1675-1680.
- Lomeli H., Tyagi S., Pritchard C., Lisardi P. and Kramer F. (1989) Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes. *Cl in Chem* 35: 1826-1831.
- Marx, A., T.J. Torok, R.C. Holman, M.J. Clarke, and L.J. Anderson (1997) . Pediatric Hospitalizations for croup (laryngotracheobronchitis): biennial increases associated with human parainfluenzavirus 1 epidemics. *J. Infect. Dis.* 176 : 1423 - 1427.
- Matsukura M., Shinozuka K., Zon G., Mitsuya H., Reitz M., Cohen J. and Boder S (1987). Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides : inhibitors

- bitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (21):7706-10.
- Messmer, T.O., K. Skelton, J. F. Moroney, H. Daugharty, and B.S. Fields (1997). Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2043 - 2046.
- Miller P, Yano J, Yano E, Carroll C, Jayaram K, Ts'o P (1979) Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochemistry* 18 (23): 5134-43.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction (1986). Gold Spring Harb. *Symp. Quant. Biol.* 1: 263-273.
- Mullis K.B. and Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction (1987). *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Nielsen P., Egholm M., Berg R. and Buchardt O. (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254 (5037): 1497-500.
- Nielsen P., Egholm M., Berg R. and Buchardt O. (1993) Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA. *Nucl. Acids Res.* 21(2): 197-200.
- Nohynek, H., J. Eskola, M. Kleemola, E. Jalonen, P. Saikku, M. Leinonen (1995). Bacterial antibody assays in the diagnosis of acute lower respiratory tract infection in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 14: 478 - 484.
- Paton, A.W., J.C. Paton, A.J. Lawrence, P.N. Goldwater, and R.J. Harris (1992). Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Microbiol.* 30: 901 - 904.
- Reznikov, M., T.K. Blackmore, J.J. Finlay-Jones and D.L. Gordon (1995).

Comparison of nasopharyngeal and throat swab specimens in a polymerase chain reaction-based test for *Mycoplasma pneumoniae*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14: 58 - 61.

Rotbart, H.A. (1990). Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 438 - 442.

Rotbart, H.A., M.H. Sawyer, S. Fast, C. Lewinski, N. Murphy, E.F. Keyser, J. Spadaro, S.Y. Kao, M. Loeffelholz (1994). Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2590 - 2592.

Saiki R.K., Bugawan T.L., Horn G.T. et al. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes (1986). *Nature* 324: 163-166.

Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487 - 491.

Saiki R.K., Walsh P.S., Levenson, C.H. and Erlich H.A. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6230-6234.

Saiki, R.K. (1990). Amplification of genomic DNA, p 13-20. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (ed.) *PCR protocols : A guide to methods and applications*. Academic Press.

Saikkku, P. (1997). Atypical respiratory pathogens. *Clin. Microbiol. Inf.* 3: 599 - 604.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, And T. Maniatis (1989). *Molecular cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.

Stauffer, F., H. Haber, A. Rieger, R. Mutschlechner, P. Hasenberger, V.J. Tevere, K.K. Young (1998). Genus level identification of mycobacteria from clinical specimens by using an easy-to-handle *Mycobacterium*-specific

- c PCR Assay. J. Clin. Microbiol. 36: 614 - 617.
- Stuyver L., Rossau R., Wyseur A. et al (1993) Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. J. Gen. Virol. 74: 1093-1102
- Trolfors, B. And B.A. Claesson (1997). Childhood pneumonia : possibilities for aetiological diagnosis. Bailliere's Clinical Paediatrics. 5: 71 - 84.
- UNICEF. (1993). Pneumonia, 3.5 millions deaths, The State of the World's Children.
- Valassina, M. A.M. Cuppone, M.G. Cusi, P.E. Valensin (1997). Rapid detection of different RNA respiratory virus species by multiplex RT-PCR: application to clinical specimens. Clin. Diagn. Virol. 8: 227 - 232.
- Van Kuppeveld, F.J.M. van der Logt, A.F. Angulo, M.J. Van Zoest, W.G.V. Quint, H.G.M. Niesters, J.M.D. Galama, and W.J.G. Melchers (1992). Genus - and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. Appl. Env. Microbiol. 58: 2606 - 2615.
- Woo, P.C., S.S. Chlu, W. H. Seto, M. Pelris (1997). Cost-effectiveness of rapid diagnosis of viral respiratory tract infections in pediatric patients. J. Clin. Microbiol. 35: 1579 - 1581.
- Wu D. and Wallace B. (1989) The ligation amplification reaction (LAR) - amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. Genomics 4:560-569.
- Yang S.Y. A standardised method for detection of HLA-A and HLA-B alleles by one-dimensional isoelectric focusing (IEF) gel electrophoresis. Immunobiology of HLA. Histocompatibility testing 1987 (ed. B. Dupont). Springer-Verlag, New York, pp. 332-335.

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1はm-R T-P C R生成物のアガロースゲル上での分離を示



す。10  $\mu$  l の m-R T-P C R 生成物を 2 % アガロースゲル上で分離した。材料および方法に記載したように、1  $\mu$  l のウイルスまたは細菌の核酸を鋳型として m-R T-P C R を行った。予想される生成物の長さは本文中に記載する。マーカーの DNA フラグメント (M s p l で消化した 0.7  $\mu$  g の p U C 1 9) のサイズ (塩基対 (b p)) は以下のとおり： 1 : 5 0 1 b p ; 2 : 4 0 4 b p ; 3 : 3 3 1 b p ; 4 : 2 4 2 b p ; 5 : 1 9 0 b p ; 6 : 1 4 7 b p ; 7 : 1 1 0 b p。

【図 2】 図 2 は陽性の m-R T-P C R 結果の割合を示す。陽性の m-R T-P C R 結果数および全試料数を y 軸に示す。x 軸上の時間目盛は 1 9 9 5 年 1 1 月から 1 9 9 8 年 4 月までである。

【図 3】 図 3 は臨床標本における陽性の m-R T-P C R 結果の頻度を示す。9 種の生物それぞれに関する陽性の m-R T-P C R 結果数を y 軸上に示す。x 軸上の時間目盛は 1 9 9 5 年 1 1 月から 1 9 9 8 年 4 月までである。

【図 4】 図 4 は感染を引き起こす生物のパーセンテージを示す。呼吸器疾患を引き起こす生物の量を、疾病を引き起こす全生物に対するパーセントで示す。試験に使用されなかった生物は図に示していない。

【図 5】 図 5 はリファレンス物質に関して行った多重-R T-P C R 後に得られたアンプリコンの 2 % アガロースゲル上での分離を示す。試験したすべての生物について予想されるサイズのバンドが個々に示される。

【図 6】 図 6 はこれらのアンプリコンと L i P A 片とのハイブリダイゼーションならびに陰性対照を示す。これらの結果は、片上のすべてのプローブがそれらに対応するアンプリコンと特異的に反応することを明確に示す。試験した異なる生物間において交差ハイブリダイゼーションは見られない。

【図1】

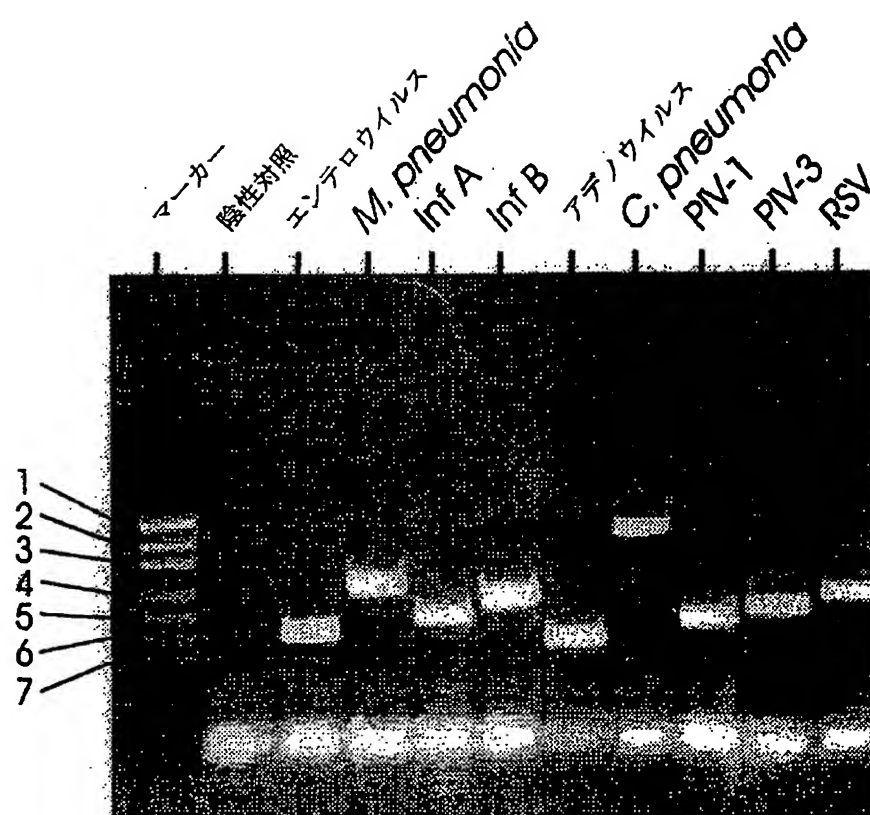


FIG. 1

【図2】

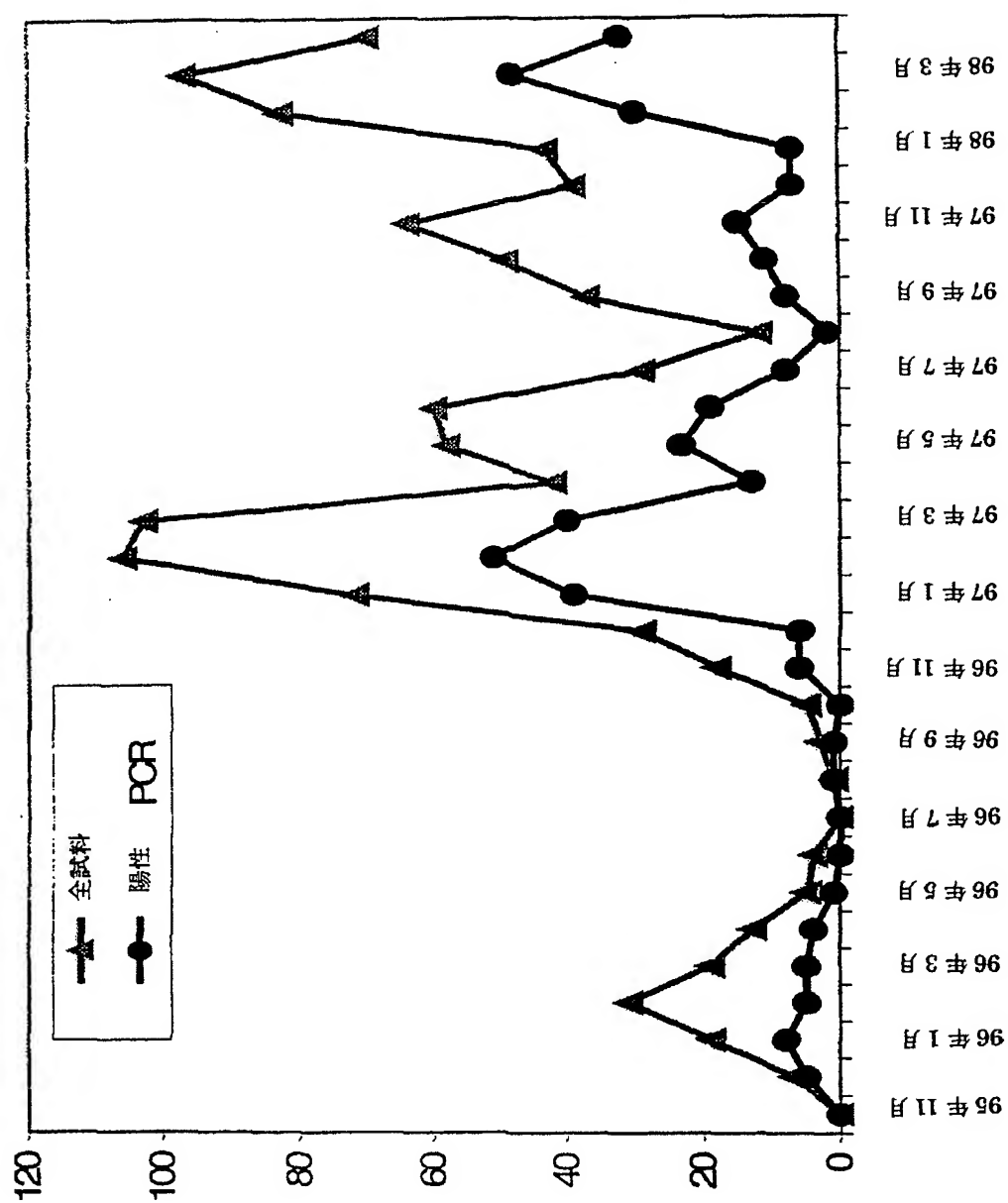


FIG. 2

【図3】

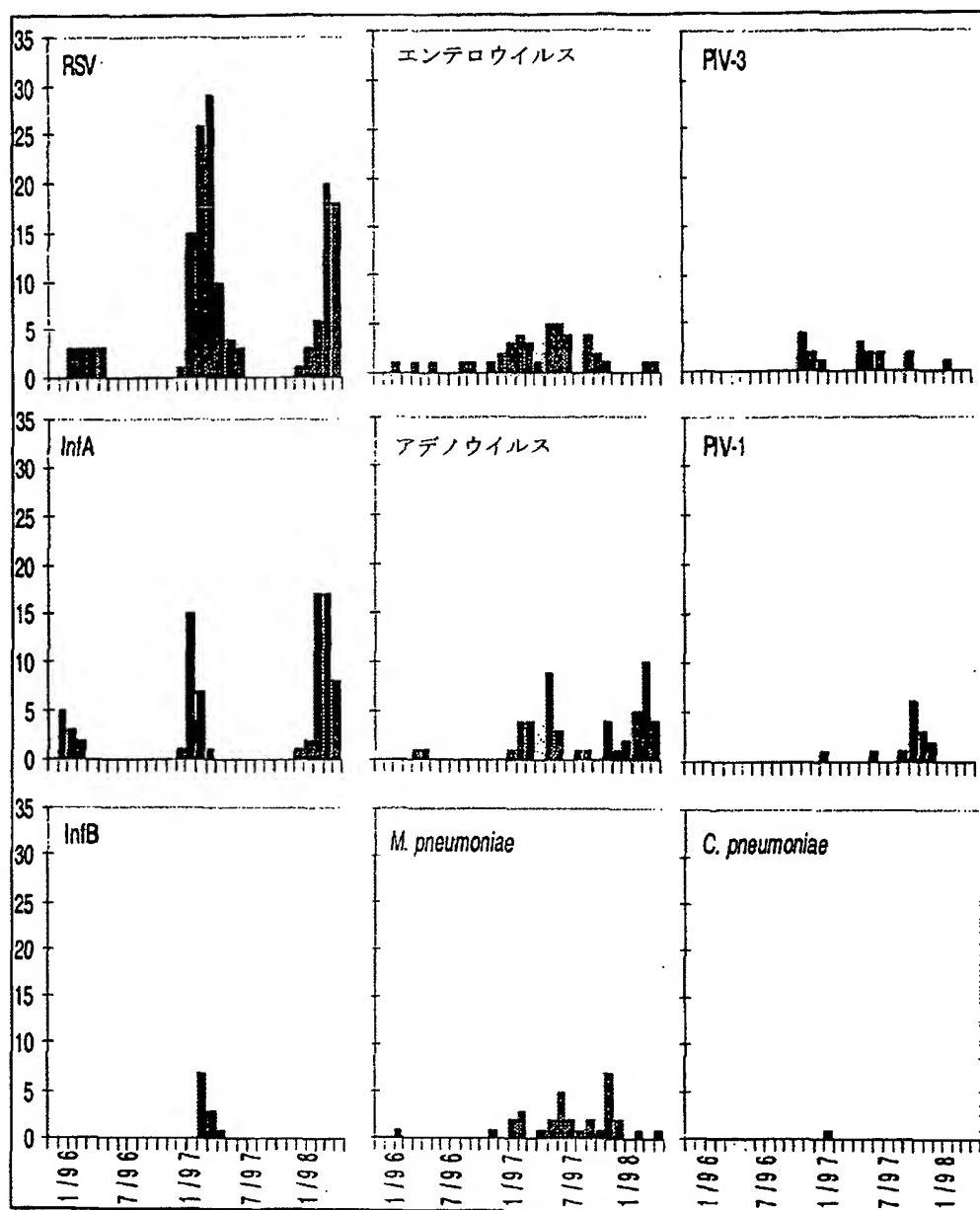


FIG. 3

【図4】

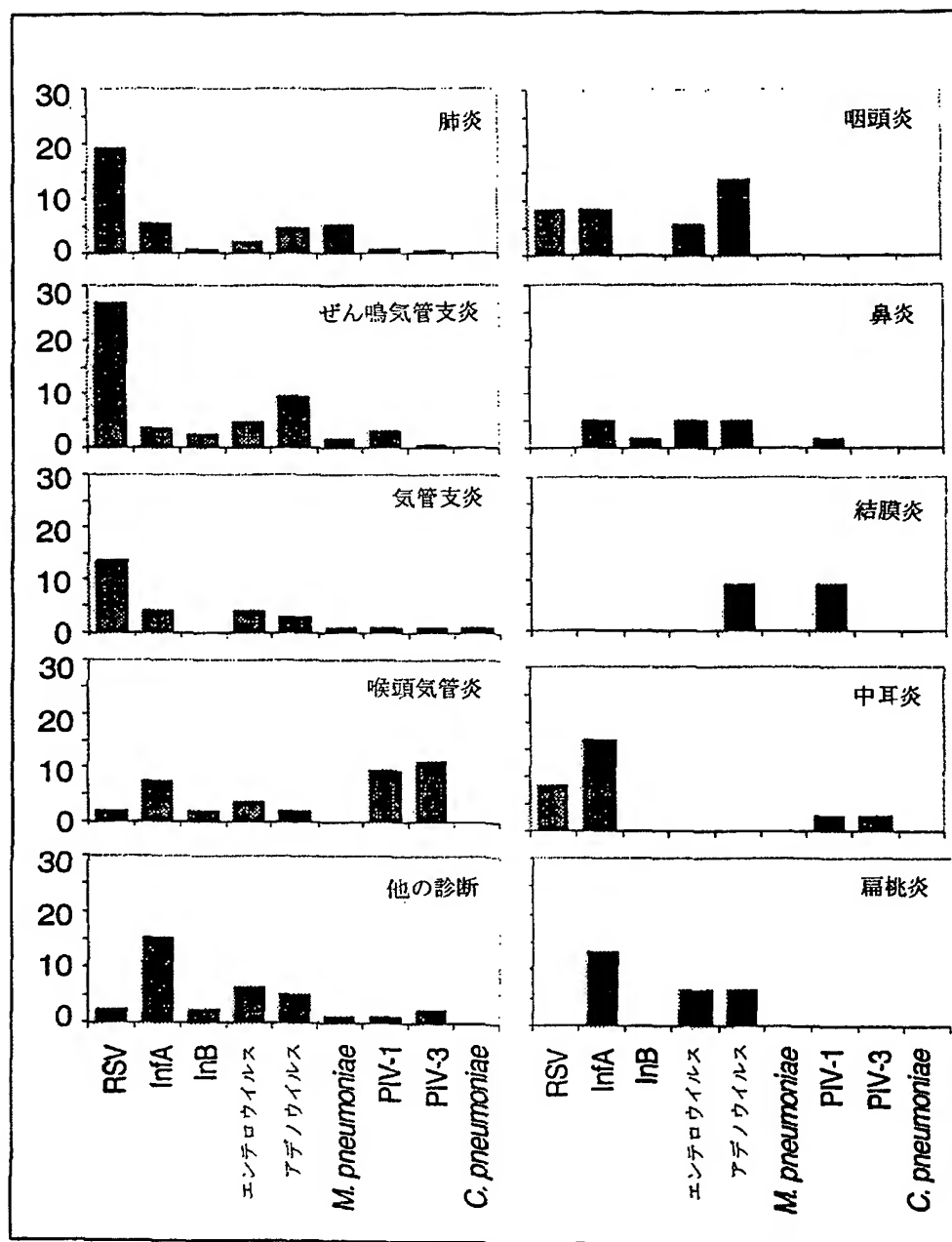


FIG. 4

【図5】

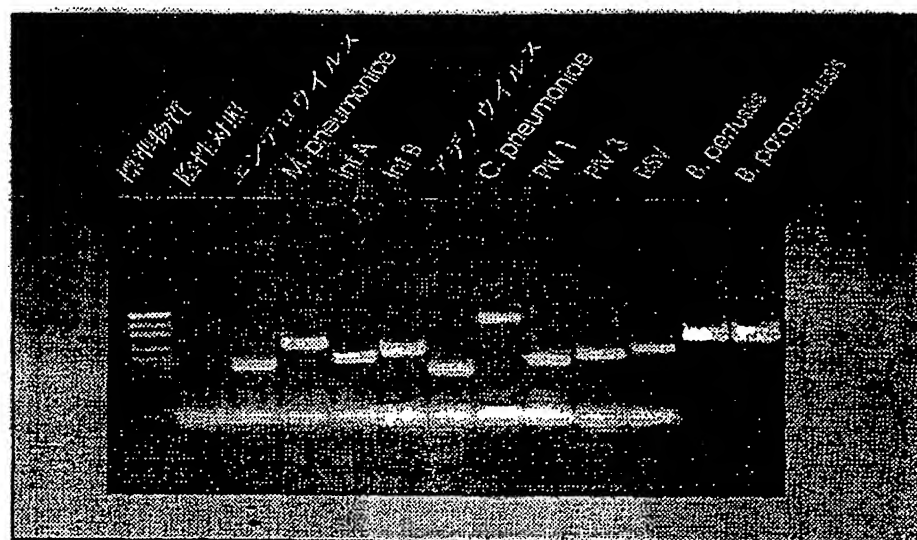


FIG. 5

【図6】

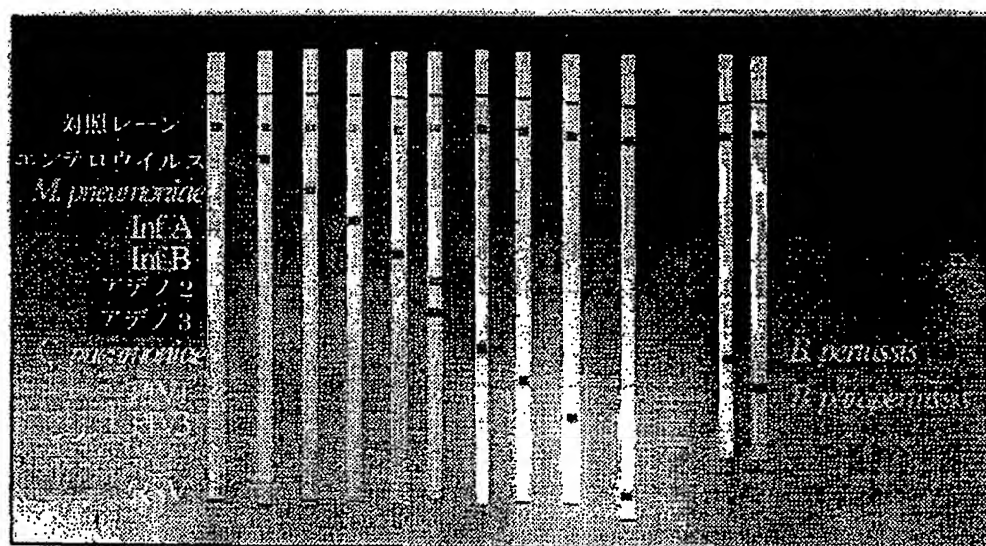


FIG. 6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.  
PCT/EP 99/07065

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MONTO A S ET AL: "Acute respiratory infections (ARI) in children: prospects for prevention" VACCINE, vol. 16, no. 16, October 1998 (1998-10), page 1582-1588 XP004129212 the whole document	1-10
Y	SAIKKU P: "Atypical respiratory pathogens" CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION, vol. 3, no. 6, December 1997 (1997-12), pages 599-604, XP002098063 cited in the application table 1	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 February 2000

Date of mailing of the international search report

29/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentleeu 2  
NL - 2200 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Osborne, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.  
PCT/EP 99/07065

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GILBERT L ET AL: "Diagnosis of viral respiratory tract infections in children by using a reverse transcription-PCR Panel" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 34, no. 1, January 1996 (1996-01), pages 140-3, XP002098027 cited in the application the whole document	1-10
Y	TROLLFORS B ET AL: "Childhood pneumonia: possibilities for aetiological diagnosis" BAILLIERE'S CLINICAL PEDIATRICS, vol. 5, 1997, pages 71-84, XP002098033 cited in the application the whole document	1-10
A	EP 0 576 743 A (ANOCO CORP) 5 January 1994 (1994-01-05) page 1, line 10 - line 18	1-10
Y	WO 98 11259 A (LUINSTRATH KATHLEEN ;CHERNESKY MAX (CA); CHONG SYLVIA (CA); DUNN JAM) 19 March 1998 (1998-03-19) the whole document	1-10
Y	ECHEVARRIA J ET AL: "Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1,2 and 3 from clinical samples by multiplex PCR." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 36, no. 5, May 1998 (1998-05), page 1138-91 XP000876835 the whole document	1-10
X	EMBL Database Entry Q06252 Accession Number Q06252: 31 Jan 1991 University Patents INC. "Probes for detecting picornavirus." XP002098007 100% identity in 21bp overlap with Seq ID No 4, of table 4	6,7
X	EMBL database entry T10170 Accession Number T10170, 24 July 1996 Mitsubishi Yuka BCL KK. "Adenovirus 3' primer binds to bases 2842-2861." XP002098008 see adenol, table 3.	6,7
P,X	DE 197 16 456 A (SCHMITT HEINZ JOSEF PROF DR) 22 October 1998 (1998-10-22) the whole document	1-10

Form PCTISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.  
PCT/EP 99/07065

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0576743 A	05-01-1994	DE 69215863 D DE 69215863 T	23-01-1997 26-06-1997
WO 9811259 A	19-03-1998	AU 4196297 A	02-04-1998
DE 19716456 A	22-10-1998	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

---

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY,  
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I  
T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ  
, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K  
E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW  
, EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, C  
U, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD  
, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN,  
IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, L  
K, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK  
, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO,  
RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, T  
M, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU  
, ZA, ZW

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 CA01 CA09 CA27

HA12

4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ42 QQ44

QQ54 QR08 QR32 QR42 QR55

QR62 QS34 QX01

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**